



Caracterización de déficits cognitivos en un modelo experimental de enfermedad de Alzheimer en ratas hembras: asociación con estados depresivos y citoquinas inflamatorias

Lucía Mechelk Méndez

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
Área Biología
Sub-área Neurociencias

Montevideo
2025



Caracterización de déficits cognitivos en un modelo experimental de enfermedad de Alzheimer en ratas hembras: asociación con estados depresivos y citoquinas inflamatorias

Lucía Mechelk Méndez

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magíster en Ciencias Biológicas en el marco del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Área Biología
Sub-área Neurociencias

Tutora: Dra. Patricia Lagos
Co-tutora: Dra. Jessika Urbanavicius y Co-tutor: Dr. Pablo Galeano

Unidad Académica de Fisiología
Facultad de Medicina, Universidad de la República

Montevideo
2025

AGRADECIMIENTOS

- A Patricia quien ha sido mi tutora durante este proceso y me ha dado la oportunidad de poder realizar esta tesis.
 - A mis co-tutores Jessika y Pablo, por su buena disposición, sus sugerencias y aportes que me han ayudado significativamente en el desarrollo de este trabajo.
 - Al tribunal, Dr. Paul Ruiz, Dra. Vanessa Athaide y Dr. Andrés Damián, por su buena disposición, sus sugerencias y aportes.
 - A Mariela y Hellen del Institut Pasteur, por recibirme en su laboratorio y ayudarme en el procesamiento de mis muestras.
 - Al personal del bioterio de la Facultad de Medicina.
 - A la CAP por financiar mi beca de maestría para poder realizar este trabajo y seguir formándome en investigación.
-
- A mi mamá, por apoyarme siempre en todo.
 - A Inti, mi mejor compañero.
 - A mis amigas y amigos de la vida, a los de la facultad, y en especial a Guada y Vani quienes han sido más que un sostén para mí en este proceso.
 - A Denis, que me ha acompañado y ayudado en gran parte de este proceso.
 - A Lore, mi psicóloga, por ayudarme en momentos difíciles de este camino.

EPÍGRAFE

*“Entender las diferencias entre los sexos en el cerebro no es una excepción, es una condición
necesaria para comprender la enfermedad.”*

— **Jill B. Becker**

LISTA DE ILUSTRACIONES

MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema 1. Protocolo experimental. Ilustración test de reconocimiento de objeto novedoso (NOR) y test de nado forzado (TNF).

Figura 1. Microfotografías representativas de los estadios del ciclo estral de la rata.

Tabla 1. Coeficiente de variación en la medición de citoquinas inflamatorias.

RESULTADOS

Figura 2. Ensayos de habituación – NOR.

Figura 3. Ensayo de muestra – NOR.

Figura 4. Ensayo de retención – NOR.

Figura 5. Test de nado forzado.

Figura 6. Niveles de citoquinas en plasma a T30.

Figura 7. Niveles de citoquinas en plasma a T120.

Figura 8. Niveles de citoquinas en hipocampo a T30.

Figura 9. Niveles de citoquinas en hipocampo a T120.

Figura 10. Niveles de citoquinas en hipocampo en grupos control a T30 y T120.

Figura 11. Niveles de citoquinas en líquido cefalorraquídeo a T120.

Figura 12. Niveles de citoquinas en líquido cefalorraquídeo a T120.

Figura 13. Niveles de citoquinas en LCR en grupos control a T30 y T120.

Figura 14. Fase del ciclo estral durante ensayos de comportamiento.

ANEXOS

Figura 1 – anexos. Resultados NOR en ratas machos.

LISTA DE ABREVIATURAS

A β : β -amiloide.

ACh: acetilcolina.

AChE: acetilcolinesterasa.

APP: Proteína Precursora Amiloidea (del inglés, *amyloid- β Precursor Protein*).

ARNm: Acido RiboNucleico mensajero.

ChAT: Colina Acetiltransferasa.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EEM: Error Estándar de la Media.

H1: Habituaación 1.

H2: Habituaación 2.

i.c.v.: intracerebroventricular.

IDE: Enzima Degradadora de Insulina (del inglés, *insulin-degrading enzyme*).

IL: Interleucina.

ISRS: Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Serotonina.

LCR: Líquido Cefalorraquídeo.

LCRa: Líquido Cefalorraquídeo Artificial.

NEP: Neprilisina

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NOR: Test de Reconocimiento de Objeto Novedoso (del inglés, *Novel Object Recognition Task*).

SNC: Sistema Nervioso Central.

STZ: Estreptozotocina.

TNF: Test de Nado Forzado.

URBE: Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación.

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo e irreversible caracterizado por la pérdida paulatina de la capacidad cognitiva, constituyendo un serio problema de salud pública a nivel mundial. Los síntomas depresivos aparecen en un alto porcentaje de pacientes con EA, siendo más frecuentes y de mayor severidad en mujeres que en hombres. Dentro de los mecanismos subyacentes comunes que explicarían la alta comorbilidad entre la EA y la depresión, se describen procesos neuroinflamatorios tales como activación de la microglía y alteración de los niveles sistémicos y cerebrales de citoquinas inflamatorias. En nuestro laboratorio, hemos ahondado en la caracterización comportamental del modelo experimental de EA esporádica inducido por la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de estreptozotocina (STZ) en ratas macho. La presencia de déficit cognitivo se comenzó a observar en una etapa intermedia del modelo en machos, 60 días luego de la administración de STZ, mientras que cambios histopatológicos vinculados a la EA, como astrogliosis, fueron evidenciados en etapas más tempranas y se mantuvieron a lo largo del tiempo. En base a estos antecedentes, y a la poca información relacionada a estudios en hembras, en el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar la presencia de comorbilidad entre déficits cognitivos y conductas pro-depresivas en ratas hembra utilizando el modelo experimental de EA esporádica inducido por STZ. Para ello, escogimos una etapa temprana y otra tardía (30 y 120 días post-STZ, respectivamente). Además, estudiamos la coexistencia de alteraciones en procesos inflamatorios como un posible mecanismo subyacente a la alta comorbilidad entre ambas patologías. Los animales fueron evaluados mediante el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (NOR) para estudiar los déficits cognitivos y luego con el test de nado forzado (TNF) para estudiar la coexistencia de conductas de tipo-depresivas. Posteriormente, cuantificamos por citometría de flujo la presencia de citoquinas inflamatorias en muestras de hipocampo, estructura implicada en procesos cognitivos y de memoria, así como en muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR). Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de déficits cognitivos tanto en la etapa temprana como tardía del modelo. Dicho déficit cognitivo se acompañó de un perfil conductual de tipo-depresivo únicamente en la etapa tardía del modelo lo cual se asoció con un aumento significativo en algunas de las citoquinas inflamatorias cuantificadas en el LCR. Estos resultados, ponen en evidencia que la alta comorbilidad entre la EA y la depresión podrían asociarse a un estado pro-inflamatorio a nivel del SNC.

PALABRAS CLAVE

En español: Enfermedad de Alzheimer; Citoquinas inflamatorias; Depresión; Déficit cognitivo; Ratas hembra

En inglés: Alzheimer's disease; Inflammatory cytokines; Depression; Cognitive deficit; Female rats.

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

La presente Tesis de Maestría se realizó en el Laboratorio de Neurotransmisión Peptídica de la Unidad Académica de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad de la República, en el marco del proyecto “Avances en la caracterización de un modelo experimental de Enfermedad de Alzheimer esporádico: estudio de mecanismos comunes con depresión” financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC I+D 2022) y por una beca de posgrado financiada por la Comisión Académica de Posgrado (CAP).

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Antecedentes generales	12
1.1.1. Generalidades sobre la Enfermedad de Alzheimer (EA)	12
1.1.2. Mecanismos fisiopatológicos vinculados a la EA	13
1.1.3. Procesos inflamatorios a nivel sistémico y central	15
1.1.4. Generalidades sobre la depresión	18
1.1.5. Mecanismos fisiopatológicos vinculados a la depresión	18
1.1.6. Relación entre la EA y la depresión: mecanismos neurobiológicos comunes	19
1.1.7. Modelo de EA esporádico inducido por STZ para el estudio de los mecanismos neurobiológicos subyacentes a la EA	20
1.2. Antecedentes particulares	22
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVO GENERAL	24
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Animales	25
5.2. Drogas y reactivos	25
5.3. Cirugía estereotáxica e inyección intracerebroventricular	26
5.4. Test comportamentales	26
5.4.1. Test de Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR)	27
5.4.2. Test de Nado Forzado (TNF)	29
5.5. Evaluación del ciclo estral	30
5.6. Obtención de muestras de plasma, tejido cerebral y LCR	31
5.7. Determinación de los niveles de citoquinas inflamatorias	32
5.8. Análisis estadístico	34
6. RESULTADOS	34
6.1. Resultados comportamentales	34
6.1.1. Desempeño de las hembras en el NOR	34
6.1.2. Desempeño de las hembras en el TNF	37

6.2. Resultados bioquímicos: cuantificación de los niveles de citoquinas inflamatorias por citometría de flujo.....	38
6.3. Resultados del ciclo estral.....	48
7. DISCUSIÓN.....	51
7.1. Las alteraciones en la memoria en hembras se manifiestan desde la etapa temprana y se mantienen en la etapa tardía.....	51
7.2. Las conductas de tipo-depresivas se evidenciaron en la etapa tardía y no en la temprana.....	53
7.3. Niveles de citoquinas inflamatorias en plasma, hipocampo y LCR.....	54
8. CONCLUSIONES GENERALES.....	61
9. PERSPECTIVAS.....	62
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
11. ANEXOS.....	83

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1. Generalidades sobre la enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de la memoria y de las funciones cognitivas (Alzheimer's Association Report 2023; Jaqua y cols., 2024). Afecta profundamente la calidad de vida de quienes la padecen y de su entorno, siendo una de las principales causas de demencia y un grave problema de salud pública, con un impacto socioeconómico a nivel mundial (Alzheimer's Association Report 2023; Yu y cols., 2025). Representa entre el 60-70% de los casos de demencia. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 55 millones de personas padecen esta enfermedad y con una mayor prevalencia en mujeres, quienes se estima que constituyen aproximadamente dos tercios de los casos (OMS, 2025; Alzheimer's Disease International, 2025, Yu y cols., 2025). Sin embargo, la mayor parte de los estudios pre-clínicos son realizados en machos (Waters et al., 2021).

En Uruguay, se estima que hay alrededor de 50.000 personas afectadas por esta enfermedad y las proyecciones establecen que para 2050 este número podría ascender a cerca de 100.000 casos (Plan Nacional de Salud Mental 2020-2027, MSP 2021).

La etiología de la EA es aún desconocida, sin embargo se reconoce a la edad como el principal factor de riesgo. La forma más prevalente es la esporádica, de inicio tardío, que representa aproximadamente el 95% de los casos. A su vez, existen variantes genéticas específicas asociadas al desarrollo de la EA de tipo familiar las cuales representan menos del 5% de los casos (Andrade-Guerrero et al., 2023; Karagas et al., 2025). Asimismo, se han identificado diversos factores que aumentan el riesgo de desarrollo de EA entre ellos, el sedentarismo, el tabaquismo, la obesidad, la exposición a sustancias que producen polución, entre otros. (Livingston y cols., 2020).

Por otra parte, diversos estudios han señalado que patologías crónicas como la diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares constituyen factores de riesgo para el desarrollo de la EA (Santiago et al., 2021). Además, es altamente co-mórbida con patologías neuropsiquiátricas, entre ellas la depresión. En particular, se ha reportado que alrededor del 40-47 % de los pacientes con Alzheimer tienen síntomas depresivos y además que las mujeres con EA tienden a presentar una mayor prevalencia y severidad de síntomas depresivos que los hombres (Aalten et al., 2007; Eikelboom et al., 2022).

1.1.2 Mecanismos fisiopatológicos vinculados a la EA

Desde el punto de vista histopatológico, la EA se caracteriza por la presencia en áreas cerebrales como el hipocampo y la corteza de depósitos intracelulares y extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) y de la proteína tau hiperfosforilada, los cuales forman las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, respectivamente (Hardy y Selkoe 2002; Ballard 2011). Además, se describe una importante pérdida neuronal y de conexiones sinápticas lo cual se asocia con el deterioro de las funciones cognitivas (Ricciarelli y Fedele, 2017; Barker et al., 2017). Actualmente, existen diversas hipótesis acerca de su etiología.

Una de ellas se basa en los depósitos extracelulares del péptido $A\beta$. La proteína precursora amiloide (APP) es procesada por dos vías, la no-amiloidogénica (procesamiento por la enzima α -secretasa) y la amiloidogénica (β y γ -secretasas), tanto en contextos fisiológicos como patológicos (Zhang et al., 2011; Chow et al., 2010). El procesamiento proteolítico de APP por la vía amiloidogénica da lugar a las diferentes isoformas del péptido $A\beta$. Este péptido monomérico soluble no se considera neurotóxico per se, sino que su toxicidad depende de su capacidad de oligomerizarse. (Walsh y Selkoe, 2007). Los oligómeros solubles emergen como los principales agentes tóxicos sinápticos (Walsh y Selkoe, 2007). Esa oligomerización se ve favorecida cuando los mecanismos de depuración del péptido, tales como el transporte reverso a través de la barrera hematoencefálica mediante la vía LRP1/P-glicoproteína o la degradación por proteasas específicas como neprilisina (NEP) y enzima degradadora de insulina (IDE, por sus siglas en inglés *insulin-degrading enzyme*), comienzan a fallar, especialmente en el envejecimiento, lo que permite que se alcance una concentración crítica de $A\beta$ en el espacio intersticial, formándose oligómeros, fibrillas y placas (Zlokovic, 2008; Morito et al., 2025). Se ha reportado que la actividad de NEP e IDE disminuye con la edad y que esta reducción está significativamente correlacionada con mayores niveles de $A\beta$ en cerebros de pacientes con EA esporádica (Cai et al., 2023; Morito et al., 2025). Las placas amiloides tienen efectos neurotóxicos provocando una disfunción en la actividad sináptica neuronal (Palop and Mucke, 2010). Además, existen evidencias que demuestran que esta alteración en el metabolismo de $A\beta$ promueve una respuesta inflamatoria y aumento del estrés oxidativo lo que finalmente contribuye a la muerte neuronal (Cheignon et al., 2018).

Otra de las hipótesis subyacentes a la etiología de la EA, postula que la presencia de A β favorece la acumulación de la proteína tau en el hipocampo y en distintas áreas de la corteza, teniendo un efecto deletéreo con pérdida de neuronas y sinapsis, provocando un déficit en la memoria y deterioro global en la cognición (Duyckaerts et al., 2009; Scholl et al., 2016; Aksman et al., 2023).

A su vez, alteraciones en varios sistemas de neurotransmisión han sido vinculados con la patogénesis de la EA, entre ellos los sistemas colinérgico y glutamatérgico. La hipótesis colinérgica de la EA sostiene que el efecto neurotóxico de los ovillos neurofibrilares causa la degeneración de las neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert. Como consecuencia, se produce una disminución de la neurotransmisión colinérgica en regiones de proyección tales como hipocampo, hipotálamo y amígdala lo que estaría en la base de las alteraciones cognitivas observadas en los pacientes con la enfermedad (Mesulam et al., 1983; 1986). Diversos estudios han demostrado que, en cerebros post-mortem de pacientes con EA, los niveles de las enzimas colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE), encargadas de la formación e hidrólisis de la acetilcolina (ACh) respectivamente, están disminuidas en la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral (Davies y Maloney 1976; Perry et al., 1977; Kolisnyk et al., 2017).

Con respecto a la neurotransmisión glutamatérgica, estudios post-mortem en cerebros de personas diagnosticadas con EA, así como evidencias provenientes de modelos animales, han evidenciado concentraciones extracelulares anormalmente elevadas de glutamato lo que se postula promovería la excitotoxicidad y la consecuente neurodegeneración, principalmente en el hipocampo y en las cortezas temporal y frontal (Kravitz et al., 2013; Olajide et al., 2021).

Además de los mecanismos etiopatogénicos mencionados, evidencia creciente sugiere que en pacientes con EA existen alteraciones en el metabolismo de la glucosa cerebral y que dichas alteraciones se producirían por un estado de resistencia a la insulina adquirido. Así, este estado de resistencia a la insulina se ha asociado con depósitos de tau y A β en corteza e hipocampo (Carbonell et al., 2025; Dewanjee et al., 2022).

Actualmente, el tratamiento para la EA es sólo sintomático y se basa en el uso de fármacos que actúan como inhibidores de la enzima AChE o antagonistas de los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Estas estrategias, si bien mejoran alguno de los síntomas cognitivos, no logran revertir la progresión de la enfermedad. Si bien hay estudios que sugieren una diferencia en la respuesta a estos

tratamientos según el sexo de los pacientes, observando una mayor eficacia en hombres que en mujeres (Davis y Barrett 2009), la evidencia es aún limitada, siendo pocos los estudios que incorporan esta variable en la evaluación de la eficacia del tratamiento (Canevelli et al., 2017; Martinkova et al., 2021).

Recientemente, el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-A β ha abierto una nueva era terapéutica en EA, ya que representan las primeras terapias con potencial modificador del curso de la enfermedad. Por ejemplo, Aducanumab mostró una reducción dosis-dependiente de placas amiloides y una desaceleración del deterioro cognitivo, aunque en otro ensayo paralelo no cumplió sus objetivos (Budd Haeberlein et al., 2022). Por otro lado, Lecanemab redujo marcadores de amiloide cerebral y produjo un enlentecimiento moderado del deterioro cognitivo y funcional en pacientes en etapas tempranas de la enfermedad (van Dyck et al., 2023). Donanemab demostró una eliminación acelerada de placas amiloides y una reducción del deterioro clínico en comparación con el placebo (Mintun et al., 2021). Sin embargo, es importante aclarar que el beneficio clínico de estas terapias es moderado, su costo es elevado y su uso requiere de una selección cuidadosa de pacientes (en etapa temprana, con confirmación de patología amiloide), además de una monitorización por resonancia magnética debido al riesgo de eventos ARIA (por sus siglas en *inglés*, *amyloid-related imaging abnormalities*) tales como edema o microhemorragias cerebrales (Alkhalifa et al., 2025; Chundu et al., 2025).

Por lo tanto, es fundamental continuar avanzando en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes e identificación de nuevos actores involucrados. A su vez, una mejor comprensión de los mecanismos que expliquen las diferencias que se observan en la incidencia diferencial de EA entre hombres y mujeres, permitirá un mejor diseño de estrategias terapéuticas. En este contexto, los procesos inflamatorios han mostrado una fuerte correlación con el inicio y la progresión de la EA y son foco de un intenso estudio en la actualidad (Caraci et al., 2018).

1.1.3 Procesos inflamatorios a nivel sistémico y central

Existe creciente evidencia que vincula los procesos inflamatorios con la patogénesis y progresión de la EA. Estudios en humanos han mostrado niveles aumentados de citoquinas inflamatorias en muestras de plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) y tejido cerebral en personas diagnosticadas con EA (Holmes et al., 2009; Khemka et al., 2014; Jayarman et al., 2021).

La alteración de los niveles de citoquinas a nivel sistémico y cerebral juega un papel crucial en los procesos neurodegenerativos de la EA, provocando alteraciones en los sistemas de neurotransmisión, en el procesamiento de la APP y la acumulación de placas A β , además de una reducción de la producción de factores neurotróficos y de la plasticidad sináptica, lo que potencia el daño neuronal mediado por procesos inflamatorios (Linnemann y Lang, 2020; Ogunmokun et al., 2021).

Las citoquinas son un grupo de proteínas no estructurales producidas por diversos tipos celulares y constituyen los principales mediadores inflamatorios (Ransohoff y Brown, 2012; Wautier y Wautier, 2023). A nivel sistémico, son producidas por macrófagos, monocitos, células dendríticas y linfocitos T, entre otros (Medzhitov, 2008; Takeuchi y Akira, 2010), mientras que a nivel del SNC son producidas principalmente por la microglía y los astrocitos (Ransohoff y Brown, 2012). Diversas evidencias clínicas, así como preclínicas, han llevado a clasificarlas de forma general en proinflamatorias y antiinflamatorias. Entre las citoquinas proinflamatorias se encuentran interleucina (IL)-1, IL-6, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el interferón γ (IFN- γ), las cuales promueven la activación del sistema inmunológico y el reclutamiento celular (Wautier y Wautier, 2023). Por otra parte, las citoquinas IL-10, IL-4 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β), limitan la inflamación y promueven la resolución del proceso inflamatorio siendo consideradas como antiinflamatorias (Wautier y Wautier, 2023). Sin embargo, es importante mencionar que esta clasificación de las citoquinas, no siempre se cumple, dado que la acción pro o antiinflamatoria de una determinada citoquina puede variar según diversos factores, como el modelo experimental utilizado, el sitio en el que actúa y la patología subyacente (Shachar y Karin, 2013).

Estudios en pacientes con EA mostraron que los niveles séricos de IL-1 β fue más alto en pacientes con EA en comparación con sujetos sanos tanto en hombres como mujeres (Khemka et al., 2014). Sin embargo, en un modelo de ratones transgénicos para la proteína IL-1 β (ratones IL-1 β XAT) se evidenció que la sobreexpresión crónica de IL-1 β en hipocampo disminuyó los depósitos de A β , teniendo un rol principalmente antiinflamatorio (Shaftel et al., 2007; Matousek et al., 2012). Este resultado fue observado de manera similar en ratones macho y hembra. Sin embargo, algunas evidencias han demostrado que estos procesos inflamatorios difieren según el sexo tanto a nivel sistémico como central (Sochocka et al., 2022; Caldwell et al., 2021). Estudios realizados en pacientes con EA mostraron niveles más bajos de inmunidad innata en mujeres, con una respuesta inflamatoria a nivel periférico y una producción disminuida de citoquinas en

comparación con los hombres. Los niveles de las citoquinas TNF- α , IL-10 e IL-1 β a nivel periférico fueron más elevados en hombres que en mujeres (Sochocka et al., 2022). Sin embargo, en mujeres, niveles elevados de IL-1 β a nivel sistémico se han asociado a un mejor desempeño cognitivo (Caldwell et al., 2021).

En un modelo *in vitro* de EA de células de neuroblastoma SH-SY5Y en cultivo diferenciadas con ácido all-trans-retinoico y factor neurotrófico derivado del cerebro humano recombinante, se estudió el efecto de la IL-18 humana recombinante bioactiva. La exposición a IL-18 promueve la modulación de proteínas clave relacionadas con el estrés oxidativo, el metabolismo de A β y la fosforilación de tau promoviendo un ambiente celular propicio para la acumulación de A β , la hiperfosforilación de tau y la pérdida neuronal (Sutinen et al., 2012).

Estudios realizados en cerebros post-mortem y en muestras séricas de pacientes hombres y mujeres con EA, han evidenciado un rol pro-inflamatorio de TNF- α , con evidencia que muestra la pérdida neuronal mediada por TNF- α en hipocampo y aumento de los niveles de TNF- α séricos asociados a un empeoramiento en la función cognitiva (Holmes et al., 2009; Jayarman et al., 2021). En este mismo sentido, estudios realizados en roedores transgénicos, muestran que la inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α mejora la función cognitiva (Shi et al., 2011). Otros estudios realizados en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína APP/PS1 (modelo de EA), y en ratones transgénicos para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e interleucina 6 (IL6) (modelo de neuroinflamación en astrocitos), muestran que IFN- γ e IL-6 tienen un rol pro-inflamatorio con activación de la microglia y astrocitos, déficits de aprendizaje y memoria a partir de los seis meses de edad (Browne et al., 2013; Millington et al., 2014). Se pone en evidencia que existe una correlación inversa entre las funciones cognitivas y los niveles séricos de IL-6 y TNF- α , lo cual fue evidenciado también en pacientes hombres y mujeres con EA y depresión, resaltando así el rol pro-inflamatorio de IL-6 y TNF- α a nivel periférico (Khemka et al., 2014).

A pesar de que diversas evidencias muestran que los procesos inflamatorios participan en los mecanismos etiopatogénicos de la EA, y que estos parecieran diferir según el sexo, aún no es claro el rol de las citoquinas inflamatorias en la patogénesis de la EA, ni su posible influencia en las diferencias observadas entre hombres y mujeres.

1.1.4 Generalidades sobre la depresión

La depresión es una de las causas principales de problemas de salud mental a nivel mundial y es dos veces más frecuente en mujeres que en hombres (Malhi & Mann 2018; Plan Nacional de Salud Mental 2020-2027 MSP 2021). En 2015, la prevalencia de trastornos depresivos en América fue del 4% en hombres, casi 6% en mujeres y del 5,7% en los adultos mayores de 60 años. Los trastornos depresivos son la principal causa de discapacidad, representando el 3,4% de los años de vida ajustados en función de discapacidad y el 7,8% de los años perdidos por discapacidad (OPS, 2018).

La depresión confiere un mayor riesgo para el desarrollo de otras patologías, entre ellas las demencias y dentro de estas particularmente la EA (Zhao et al., 2016; Wang et al., 2018; Hernández et al., 2022).

1.1.5 Mecanismos fisiopatológicos vinculados a la depresión

Se han postulado diversas hipótesis sobre los mecanismos que explicarían la depresión. Una de las hipótesis más aceptada es la monoaminérgica, que establece que existe una alteración en la neurotransmisión noradrenérgica, serotoninérgica y dopaminérgica (Schildkraut, 1965; Coppen et al., 1967).

Sin embargo, más recientemente, los procesos inflamatorios crónicos han demostrado desempeñar un papel importante en la depresión, de hecho, se ha propuesto a esta patología como un desorden psiconeuroinmunológico, relacionando el aumento de marcadores inflamatorios tanto con la severidad de los síntomas depresivos así como las alteraciones cognitivas que aparecen en la enfermedad (Schiepers et al., 2005). Se ha reportado que pacientes diagnosticados con depresión presentan niveles plasmáticos significativamente más altos de citoquinas inflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF- α y niveles más bajos de citoquinas antiinflamatorias, como IL-4, IL-10 y TNF- β 1, en comparación con sujetos sanos (Miller et al., 2009). Además, se han encontrado niveles elevados *post-mortem* de IL-6 y TNF- α en suero, LCR y en las cortezas prefrontal y orbitofrontal de pacientes diagnosticados con depresión (Tonelli et al., 2008; Enache et al., 2019; Peters et al., 2021). Estos datos sugieren la existencia de una correlación positiva entre la severidad de los síntomas depresivos y un aumento de los procesos inflamatorios (Schiepers et al., 2005).

Resulta interesante destacar las evidencias en humanos que muestran que las alteraciones en marcadores inflamatorios varían según el sexo. En particular, ha sido

demostrado que las mujeres con depresión muestran niveles más altos de marcadores inflamatorios tales como IL-6 y TNF- α , en comparación con los hombres, con una mayor correlación entre estos niveles y la severidad de los síntomas (Labaka et al., 2018, Elgellaie et al., 2023). Sin embargo, aunque la evidencia sobre los procesos inflamatorios asociados a la depresión es cada vez mayor, los mecanismos que explicarían su incidencia diferencial entre hombres y mujeres aún no se comprenden por completo.

Los tratamientos farmacológicos actualmente utilizados para el tratamiento de la depresión tienen acción sobre los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico, aumentando la biodisponibilidad de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica (Cipriani et al., 2018). En la actualidad, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) se consideran el tratamiento farmacológico de primera línea para la depresión (OMS, 2023). Sin embargo, estos fármacos presentan una demora en la aparición del efecto terapéutico y existe un alto porcentaje de pacientes que no responden, lo que constituye una importante limitación e impacta negativamente en el manejo de la enfermedad (Pigott et al., 2023). Por ello, resulta importante el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas a través del estudio de otros mecanismos.

1.1.6 Relación entre la EA y la depresión: mecanismos neurobiológicos

La disfunción del sistema inmunológico se ha propuesto como uno de los mecanismos más relevantes que vinculan la depresión con el deterioro cognitivo y la EA, y que además podrían contribuir a explicar las diferencias observadas según el sexo (Hayley et al., 2021). Diversas evidencias señalan que la depresión podría representar una manifestación temprana de un proceso inflamatorio que, de mantenerse en el tiempo, puede inducir estrés oxidativo, alterar la plasticidad sináptica, reducir la disponibilidad de factores neurotróficos y así favorecer la disfunción neuronal y con ello la progresión hacia el deterioro cognitivo y demencia (Alexopoulos, 2019; Jang et al., 2025). En este sentido, la alteración en los procesos neuroinflamatorios, como la activación de astrocitos y microglía, así como la alteración en los niveles sistémicos y cerebrales de citoquinas pro- y antiinflamatorias, desempeñan un papel central en la fisiopatología tanto de la depresión como de la EA (Rojo et al., 2008; Caraci et al., 2018; Alexopoulos, 2019).

Asimismo, las diferencias entre sexos en la prevalencia y evolución de ambas patologías podrían explicarse por variaciones en la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Se postula que factores hormonales como los estrógenos modulan la activación microglial y producción de citoquinas pro- y antiinflamatorias, generando distintos perfiles

inflamatorios en ambos sexos, con una mayor susceptibilidad a la neuroinflamación en las mujeres luego de la menopausia por la disminución en los niveles de estrógenos (Hayley et al., 2021).

Mientras que las citoquinas antiinflamatorias podrían ejercer un efecto protector, la neuroinflamación se postula como el mecanismo responsable de la secreción anormal de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α e IL-6, las cuales inducirían daño en las estructuras cerebrales y un deterioro progresivo de la función cognitiva (Myint & Kim, 2014). El aumento de citoquinas también ocasionaría alteraciones en los sistemas serotoninérgico y glutamatérgico, acumulación de subproductos tóxicos derivados del estrés oxidativo, y la reducción en la producción de factores neurotróficos y en la plasticidad sináptica a nivel cerebral (Myint & Kim, 2014; Linnemann & Lang, 2020). En este sentido, se ha observado que los antidepresivos podrían disminuir la incidencia de la EA al incrementar los niveles de la citoquina antiinflamatoria TGF- β 1 (Caraci et al., 2018).

En el modelo de EA esporádico inducido por estreptozotocina (STZ) se han descrito conductas compatibles con un perfil pro-depresivo (Souza et al., 2017). En este sentido, un estudio reciente realizado en ratas macho y hembra utilizando el modelo de EA esporádica inducido por STZ mostró que el ejercicio físico tiene un rol antidepresivo lo cual se asoció con un aumento en los niveles de IL-10 y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo de ratas hembras, no así en machos (Naghbi et al., 2021). Estos resultados sugieren que los niveles cerebrales de BDNF y citoquinas inflamatorias se modifican de forma dependiente del sexo en este modelo de EA. Sin embargo, aún se debe profundizar más en el estudio de estos marcadores inflamatorios como posibles dianas terapéuticas en el tratamiento tanto de la EA como de la depresión y sus diferencias entre ambos sexos.

1.1.7 Modelo de EA esporádico inducido por STZ para el estudio de los mecanismos neurobiológicos subyacentes a la EA

El avance en la comprensión de la neurobiología de la EA, así como el estudio de los mecanismos subyacentes en vistas a la identificación de nuevos blancos terapéuticos, se ha visto enriquecido en base al uso de modelos experimentales preclínicos.

El modelo de EA esporádica inducido por la administración i.c.v. bilateral de STZ, ya mencionado, logra poner en evidencia algunas características clínicas, así como algunos de los procesos fisiopatológicos que subyacen a la EA en humanos (Nitsch y

Hoyer, 1991; Salkovic-Petrisic, 2006). La STZ es una droga que al ser administrada por vía sistémica se incorpora a las células a través del transportador de glucosa GLUT-2 produciendo la muerte celular de las células β -pancreáticas, con un efecto diabetogénico, siendo ampliamente utilizada como modelo de diabetes del tipo I (Lenzen et al., 2008). Sin embargo, cuando se administra en el cerebro vía i.c.v., produce un estado de resistencia a la insulina a nivel local, sin afectar el metabolismo de la glucosa a nivel sistémico (Nitsch y Hoyer, 1991).

Es importante destacar que en pacientes con deterioro cognitivo y EA ha sido descrita una alteración en el metabolismo de la glucosa (Dewanjee et al., 2022; Carbonell et al., 2025). Los pacientes con EA presentan una expresión reducida de insulina y de sus receptores a nivel cerebral, lo cual conduce a una alteración de la vía de señalización de la insulina y resistencia a la misma, afectando el metabolismo cerebral y las funciones cognitivas, habiéndose postulado este fenómeno como una diabetes tipo III (Salkovic-Petrisic et al., 2006; Leszek et al., 2017).

Es así que la administración i.c.v de STZ a dosis subdiabetogénicas, induce alteraciones en el metabolismo cerebral e histopatológicas observadas en el cerebro de pacientes con EA esporádica, por lo tanto constituyendo un modelo preclínico con buena validez de constructo (Nitsch y Hoyer, 1991). En particular, utilizando ratas macho algunos estudios han descrito una disminución del número de neuronas en hipocampo y corteza cerebral con aumento del número de células gliales a partir de los 30 días luego de la inyección i.c.v de STZ y la aparición de depósitos de A β y ovillos neurofibrilares a partir de los 90 días luego de la inyección i.c.v de STZ (Salkovic-Petrisic et al., 2006, 2013). Sin embargo, algunas alteraciones como la disminución del número de neuronas en hipocampo y corteza no son consistentes entre estudios (Niño-Rivero et al., 2025). Desde el punto de vista conductual, utilizando distintos ensayos comportamentales tales como el laberinto acuático de Morris y la prueba de evitación pasiva, se ha evidenciado que la administración i.c.v de STZ produce déficits cognitivos afectando el aprendizaje espacial, la memoria declarativa y no declarativa, y que estas alteraciones aparecen en etapas tempranas o intermedias (15 días o 60 días post-STZ) y progresan hasta etapas tardías (180 días post-STZ) (Salkovic-Petrisic et al., 2006, 2013; Knezovic et al., 2015; Niño-Rivero et al., 2025).

Aunque este modelo ha sido utilizado desde hace varios años, la mayoría de estas evidencias son utilizando ratas macho (Nitsch y Hoyer, 1991; Salkovic-Petrisic et al., 2006, 2013; Niño-Rivero et al., 2025). Sin embargo, recientemente han surgido trabajos

que utilizan el modelo de EA esporádico inducido por STZ en ratas hembra (Bao et al., 2017; Naghibi et al., 2021; López Hanotte et al., 2024). El trabajo realizado por Bao et al. (2017) evidenció la presencia de déficit cognitivo mediante el ensayo de laberinto acuático de Morris 30 días luego de la administración i.c.v. bilateral de STZ en ratas macho pero no en hembras, no siendo exploradas otras etapas del curso evolutivo en este modelo, más allá de los 30 días post-STZ (Bao et al., 2017). De manera interesante, algunos trabajos estudiaron la presencia de alteraciones emocionales, encontrando un aumento en las conductas de tipo-depresivas en ratas macho y hembras en el test de nado forzado (TNF) 30 días post-STZ (Naghibi et al., 2021). Más interesante aún es que algunos mecanismos explorados se vinculan a estados inflamatorios. El trabajo realizado por Naghibi et al. (2021), si bien estudió la presencia de conductas de tipo-depresivas y no la presencia de déficit cognitivo, evidenció en los animales que presentaron conductas de tipo-depresivas una diferencia en los niveles de marcadores inflamatorios dependiente del sexo. Así, detectaron un aumento en los niveles de TNF- α en el hipocampo tanto en machos como en hembras, aunque solamente en ratas hembras fue evidenciado un aumento de TNF- α y una disminución en los niveles de IL-10 en la corteza prefrontal (Naghibi et al., 2021).

A pesar de que los estudios que vinculan la EA o la depresión con procesos neuroinflamatorios han ido en aumento, aún existe escasa evidencia sobre su comorbilidad en ratas hembras en este modelo, y los mecanismos que subyacen a las diferencias en los estados pro-inflamatorios entre ambos sexos aún no son del todo comprendidos, siendo fundamental avanzar en la comprensión de los mismos.

1.2. ANTECEDENTES PARTICULARES

En nuestro laboratorio desde hace años estamos trabajando en el modelo de EA esporádica inducido por la administración i.c.v. bilateral de STZ en ratas macho y hemos caracterizado el curso temporal de alteraciones morfológicas y conductuales relacionadas con la memoria, aportando nueva evidencia a lo que estaba publicado anteriormente para este modelo (Salkovic-Petrisic et al., 2006; Knezovic et al., 2015; Knezovic y Salkovic-Petrisic, 2025). En particular, hemos realizado una caracterización extensa del curso temporal de las alteraciones conductuales y morfológicas, evaluando a distintos tiempos post-STZ (y su vehículo): 15, 30, 60, 90 y 120 días.

En cuanto a los estudios morfológicos, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para detectar fibras y neuronas colinérgicas (ChAT +), astrocitos

(GFAP+) y neuronas (NeuN+). Por una parte, detectamos la presencia de modificaciones morfológicas en sub-regiones del hipocampo (CA1 y CA3), evidenciadas por una disminución en la densidad de fibras colinérgicas a los 60, 90 y 120 días post-STZ, aunque no se observaron modificaciones en el giro dentado ni en el número de neuronas colinérgicas en la corteza cerebral en ninguno de los estadíos al compararlo con los animales control. De forma interesante, también se evidenció un aumento significativo en el área inmunoreactiva para GFAP en CA1 y CA3 en todos los tiempos estudiados, desde 15 hasta 120 días post-STZ, si bien no puede establecerse si dicho aumento en el área reactiva está dado por un aumento en el número de astrocitos o por un aumento en el área ocupada por los mismos. A nivel del giro dentado, se detectó un aumento significativo en el área reactiva para GFAP a partir de los 60 días, permaneciendo aumentada hasta los 120 días post-STZ. Así también, en la corteza el aumento en el área reactiva para GFAP se observó en los 60 y 120 días post-STZ, comparando con los controles. Es de señalar que no fueron observadas modificaciones en el número de neuronas NeuN+ en ninguna de las regiones analizadas en ninguno de los grupos experimentales (Niño-Rivero et al., 2025). Este conjunto de resultados obtenidos en ratas machos sugieren que este modelo de EA es considerado un modelo de astrogliosis con disminución de inervación colinérgica y déficits cognitivos asociados a estructuras relacionadas con procesos de memoria.

Las modificaciones comportamentales observadas fueron detectadas al realizar el test de reconocimiento del objeto novedoso (NOR del inglés *novel object recognition*), una prueba que evalúa la memoria de reconocimiento. Los resultados obtenidos en ratas macho mostraron que a partir de los 60 días post-STZ, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo de exploración del objeto familiar y objeto novedoso, evidenciándose un déficit cognitivo de memoria de reconocimiento. Dicho déficit continuó detectándose en los tiempos posteriores analizados, a los 90 y 120 días post-STZ (Niño-Rivero et al., 2025).

Es importante destacar que fue a partir de este conjunto de resultados morfológicos, principalmente lo que se relaciona con la astrogliosis, y comportamentales, observados en ratas macho, que se definió el curso temporal de este modelo de EA en una etapa temprana (15 y 30 días post-STZ), una intermedia (60 y 90 días) y una tardía (120 días post-STZ). A modo de conclusión, resaltamos que, desde una etapa temprana ya fue detectada una astrogliosis significativa que permaneció durante todas las etapas estudiadas, en regiones claves para los procesos de memoria como CA1 y CA3. Así

también, esta astrogliosis fue acompañada de una disminución en la innervación colinérgica en las mismas regiones, aunque a partir de una etapa intermedia, a los 60 días post-STZ, lo cual se acompañó de una astrogliosis a nivel del giro dentado. Por lo tanto, se sugiere que en ratas macho los procesos inflamatorios a nivel cerebral producidos por la STZ se evidencian ya desde etapas tempranas, detectados a través del aumento del área reactiva para GFAP.

Es así que, dado que la EA y la depresión presentan una mayor prevalencia en mujeres, que los procesos inflamatorios mediados por citoquinas participan en ambas patologías, y considerando las evidencias morfológicas y comportamentales obtenidas previamente en ratas macho con el modelo pre-clínico de EA inducido por STZ, consideramos de importancia determinar en una etapa temprana (30 días) y una tardía (120 días), si el déficit cognitivo en hembras se manifiesta desde la etapa temprana y se mantiene en la etapa tardía, y si dicho déficit se relaciona con estados pro-depresivos, incorporando el estudio del rol de los mecanismos inflamatorios sistémicos y centrales asociados a citoquinas.

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es:

2. HIPÓTESIS

Las alteraciones cognitivas en hembras se manifestarán desde una etapa temprana en el modelo de EA inducido por STZ e irán acompañadas de conductas de tipo-depresivas y se mantendrán en la etapa tardía. Los cambios conductuales detectados irán acompañados de un aumento en los niveles de citoquinas inflamatorias tanto a nivel periférico como central, en ambas etapas.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el desempeño comportamental relacionado a la memoria y a conductas de tipo-depresivas en ratas hembras en una etapa temprana y tardía del modelo experimental de EA inducido por STZ y determinar los niveles sistémicos y centrales de citoquinas inflamatorias.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el desempeño cognitivo de las hembras en una etapa temprana (30 días) y en otra tardía (120 días) del modelo de STZ en el NOR.

2. Evaluar el desempeño de conductas tipo-depresivas de las hembras en una etapa temprana (30 días) y en otra tardía (120 días) del modelo de STZ en el TNF.
3. Cuantificar los niveles de citoquinas inflamatorias centrales (en LCR e hipocampo) y periféricas (en plasma), mediante citometría de flujo, en hembras en una etapa temprana (30 días) y en otra tardía (120 días) del modelo de STZ.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras adultas de 200-300 gramos provenientes de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, UdelaR. Los animales fueron alojados en grupos de 4 animales por caja bajo condiciones de temperatura y humedad controladas en un ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas con encendido de luces a 06:00 hs. Los animales recibieron agua y comida *ad libitum*.

En total se emplearon 45 ratas hembra Sprague Dawley. Durante el procedimiento experimental se registró una mortalidad de 13% (n=6), principalmente asociada a complicaciones anestésicas en la cirugía estereotóxica.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo con las normas éticas aprobadas por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Medicina, (Nº de protocolo experimental 070151-000028-22). Se tomaron las medidas necesarias para garantizar el bienestar de los animales utilizando el número mínimo de animales necesario para obtener resultados reproducibles y confiables.

5.2. Drogas y reactivos

La ketamina (50 mg/ml) y la xilacina (20 mg/ml) fueron obtenidas de Richmond Vet Pharma (Argentina). El acedan 1% fue obtenido de Holliday Scott (Argentina). El isofluorano fue obtenido de Terrel (Piramal Pharma Ltd, Telangana state, India) y el uretano 1.2 gr/kg fue obtenido de Sigma-Aldrich ((# U-2500).

La STZ fue obtenida de Sigma-Aldrich (# S-0130). La misma fue disuelta en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) a una concentración de 50 mg/ml y pH entre 7.36-7.44. El LCRa se compone de CaCl_2 1.15 mM, NaCl 120 mM, KCl 2 mM, MgCl_2 0,8 mM, NaH_2PO_4 0,33 mM y NaH_2CO_3 27 mM disueltos en agua destilada.

5.3. Cirugía estereotáxica e inyección i.c.v.

Los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano para la inducción y posteriormente por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (75 mg/kg), xilacina (5 mg/kg) y acedan (1.5 mg/kg) y colocados en un aparato estereotáxico.

El LCRa o la STZ fueron inyectados de forma bilateral i.c.v. a través de una jeringa Hamilton de 100 µl en dos días distintos. Las coordenadas de microinyección fueron definidas a partir de bregma según el atlas de Paxinos y Watson (2005) y fueron las siguientes: AP: -1.0, L: ± 1.8 , DV: -3.4. La dosis de inyección fue 3 mg/kg en un volumen final de 30 µl alcanzados mediante dos inyecciones separadas por 48 hs (día 1 y día 3). Luego de la microinyección, la jeringa permaneció en el sitio durante 5 minutos para permitir una adecuada difusión del volumen microinyectado.

Durante ambas cirugías los animales recibieron analgésico (ketoprofeno 1 mg/kg subcutáneo– NaxPet 0,4 mg/ml) y antibiótico (amoxicilina 1 mg/kg subcutáneo – Clamoxyl L.A. 153 mg/ml).

Luego de las cirugías los animales fueron mantenidos en cajas individuales hasta su recuperación de la anestesia y posteriormente devueltos a sus cajas en grupos de cuatro y trasladados nuevamente a URBE hasta la realización de los experimentos conductuales. Cada semana se monitorizó el estado general de salud y el peso de los animales.

5.4. Test comportamentales

Todos los experimentos comportamentales fueron llevados a cabo en un cuarto de comportamiento con condiciones ambientales de temperatura (22°C) y ciclo luz-oscuridad controladas y similares a las de su alojamiento en URBE. Los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento tres días antes del comienzo de los ensayos conductuales para una correcta habituación al ambiente.

El protocolo utilizado incluyó tres sesiones de manipulación o *handling* de 5 minutos de duración durante los tres días previo a los test conductuales (esquema 1 A, protocolo experimental). El *handling* es una estrategia utilizada para habituar a los animales a la manipulación minimizando la respuesta de estrés a la novedad y mejorando así el bienestar de los animales (Bigelow et al., 2023). El procedimiento de *handling* consistió en la sujeción de los animales e imitación de los procedimientos que se desarrollaran el día del experimento y fue realizado de forma individual y siempre por la misma experimentadora (la tesista). Las condiciones experimentales para el desarrollo del NOR fueron determinadas basados en la experiencia previa de nuestro grupo en el uso

del modelo en ratas macho. Sin embargo, el protocolo experimental utilizado fue optimizado para su uso en hembras. Un ensayo piloto mostró que las hembras presentaban un patrón de comportamiento más ansioso que los machos dado que exploraron menos la zona central de la caja de comportamiento. En base a este resultado se incluyó una sesión más de *handling* en comparación con lo previamente descrito por nuestro grupo (Ruiz-Viroga et al., 2023).

5.4.1. Test de Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR)

El NOR es un ensayo comportamental que permite evaluar un tipo de memoria episódica en roedores, y es ampliamente utilizado para evaluar el desempeño cognitivo de los animales y detectar alteraciones en la memoria. Consiste en situar a los animales en una arena (campo abierto) donde se evalúa la memoria de reconocimiento de un objeto previamente explorado (objeto familiar) en comparación con un objeto nuevo (objeto novedoso). El modelo se basa en la preferencia natural de los roedores por la novedad (Ennaceur y Delacour, 1988). El reconocimiento del objeto novedoso en ratas puede medirse por la diferencia en el tiempo de exploración del objeto novedoso respecto al objeto familiar (Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur 2010; Galeano et al., 2014).

El NOR se realizó en un campo abierto que consiste en una caja cuadrada de 80 x 80 cm de color negro con paredes de 40 cm de altura. En su base posee líneas blancas que determinan cuadrantes de 20 x 20 cm (esquema 1 B, Ilustración test de reconocimiento de objeto novedoso). El campo abierto se iluminó de forma indirecta con una intensidad de luz de 5-15 luxes distribuidos de forma homogénea en las esquinas y el centro del campo, para evitar sesgos o preferencias de los animales por lugares de mayor oscuridad (Shanazz et al., 2021). Las condiciones de iluminación se mantuvieron iguales durante todos los días en que duró el experimento. Se emplearon dos pares de objetos: matraces Erlenmeyer con franjas verticales negras (17 cm de altura) y frascos cilíndricos de vidrio con franjas horizontales blancas (17 cm de altura) de acuerdo a antecedentes del grupo (Ruiz-Viroga et al., 2023). Ambos juegos de objetos tenían un tamaño y peso adecuados para que las ratas no pudieran moverlos ni subirse sobre ellos. Todos los experimentos fueron grabados por una cámara de video ubicada en la parte superior y central del campo. Antes y después de cada prueba, el campo abierto y los objetos fueron limpiados con etanol al 70% y secados. El ensayo comportamental comienza con una etapa de habituación al campo abierto. Se realizaron dos sesiones de habituación de 10 minutos de duración separadas por 24 horas en ausencia de objetos (habituación 1 (H1) y 2 (H2);

esquema 1). En ambas sesiones de habituación se analizó la actividad motora de los animales mediante la cuantificación de los siguientes parámetros: número de cruces de los cuadrantes (como índice de actividad locomotora), número de *rearings* (actividad exploratoria vertical), acicalamientos o *groomings* y cruces por el cuadrado central de la caja como indicadores de ansiedad.

Veinticuatro horas después de la última sesión de habituación las ratas fueron expuestas durante 5 minutos a un par de objetos idénticos colocados en una posición simétrica cerca de dos de las esquinas (ensayo de muestra; esquema 1). La posición de los objetos en las esquinas fue contrabalanceada entre los diferentes animales para evitar sesgos de posición de los objetos. Veinticuatro horas después, en el ensayo de retención, uno de los objetos fue reemplazado por un objeto novedoso manteniendo la misma posición de los objetos que se había utilizado para el ensayo de muestra y se registró la conducta de exploración durante 5 minutos. Se cuantificó de forma manual a partir de los videos, el tiempo en que cada una de las ratas exploró cada objeto, tanto en el ensayo de muestra como en el de retención. El tiempo de exploración de los objetos se consideró como aquel en el que el hocico del animal estaba a menos de 2 cm de distancia del objeto. No se consideró como tiempo de exploración los *rearings* apoyados en el objeto o cualquier otro tipo de conducta.

A partir de los tiempos de exploración registrados durante el ensayo de retención, se obtuvo el índice de discriminación $d2$ calculado de la siguiente manera $d2 = (t_n - t_f) / (t_n + t_f)$, donde t_n es el tiempo de exploración del objeto novedoso y t_f el tiempo de exploración del objeto familiar (Galeano et al., 2014; Ruiz-Viroga et al., 2023).

En este ensayo comportamental, se espera que durante el ensayo de retención los animales reconozcan el objeto novedoso como tal, y por lo tanto lo exploren durante más tiempo en comparación al objeto familiar. En este caso el índice de discriminación $d2$ será significativamente mayor a cero. De esta forma, tiempos de exploración similares en ambos objetos son indicadores de una afectación en la memoria (Ruiz-Viroga et al., 2023).

5.4.2. Test de Nado Forzado (TNF)

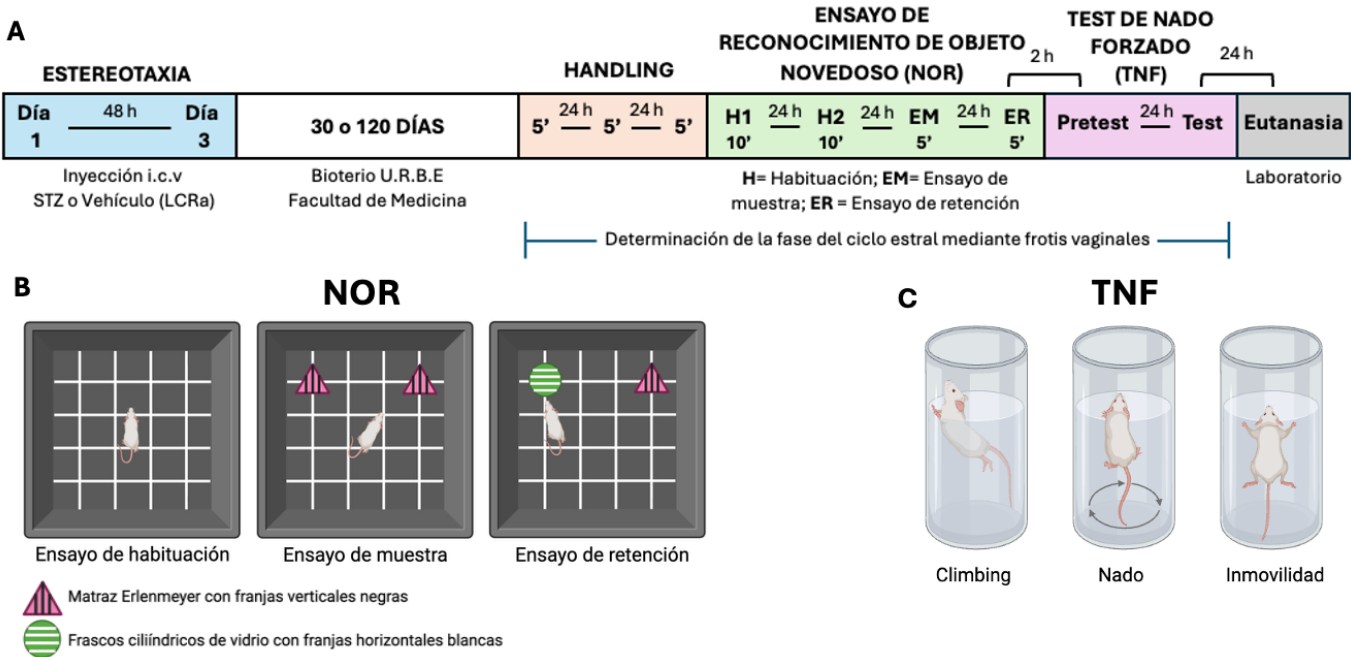
El TNF es una prueba descrita originalmente por Porsolt en 1978 (Porsolt et al., 1978). Está basado en la observación de que los roedores expuestos a una situación de nado inescapable (estímulo estresor, relacionado con estar en el agua) desarrollan una postura denominada de inmovilidad, durante la cual los animales realizan únicamente

aquellos movimientos necesarios para mantenerse a flote (Porsolt et al., 1978; 2001). El TNF, de forma general, es ampliamente utilizado por su sensibilidad a la acción de drogas con perfil antidepresivo permitiendo realizar un rápido *screening* de nuevas drogas o estrategias terapéuticas al ser administradas por vía sistémica o central. Un efecto antidepresivo en el TNF se evidencia como un aumento de los comportamientos activos de nado de los animales (desplazamiento horizontal en el cilindro con agua) y escalamiento o *climbing* (movimientos ascendentes, usualmente sobre las paredes del cilindro), mientras que se detecta una disminución en el tiempo de inmovilidad (Figura 3; Cryan et al., 2005).

Para la realización del TNF se utilizó un recipiente cilíndrico de acrílico transparente de 24 cm de diámetro y 50 cm de alto, que es rellenado con agua corriente a una temperatura de 23-24 °C hasta una profundidad de 34 cm.

Los animales fueron expuestos a dos sesiones de nado. La primera sesión denominada *pretest*, se realizó 2 horas luego de culminado el ensayo de retención en el NOR. En el *pretest*, los animales fueron colocados en el recipiente con agua durante 15 min y, posteriormente, fueron secados mediante secador y toallas, y devueltos a sus cajas originales. Veinticuatro horas después, los animales fueron sometidos a una segunda sesión de nado de 5 min de duración (el *test* propiamente dicho) durante la cual se cuantificó el tiempo de nado, de inmovilidad y escalamiento por observación directa de la experimentadora y corroborados a partir de los videos obtenidos de acuerdo al protocolo experimental (esquema 1).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL



Esquema 1. Protocolo experimental y ensayos comportamentales.

(A) Protocolo experimental, incluye la cirugía estereotáxica, el *handling*, el test de reconocimiento de objeto novedoso (NOR) – compuesto por las sesiones de habituación 1 y 2 (H1, H2), ensayo de muestra (EM) y ensayo de retención (ER) – y el test de nado forzado (TNF). Finalizados los ensayos comportamentales se realizó la extracción de LCR, seguida de eutanasia por guillotina para la obtención de sangre (plasma) y posterior disección del hipocampo. (B) Ilustración del NOR. (C) Ilustración del TNF.

5.5. Evaluación del ciclo estral

Debido a las evidencias de la influencia hormonal en diversos procesos (Berridge et al., 2022; Pestana y Graham 2024) y de forma de poder asociar las posibles modificaciones a nivel conductual con la etapa del ciclo estral, se determinaron las etapas del ciclo estral de todas las ratas hembra mediante citologías vaginales. Las mismas fueron realizadas entre las 9:00-9:30 am y de manera diaria durante el período de realización de los experimentos conductuales (esquema 1). Para tomar la muestra vaginal se realizó un lavado con agua destilada utilizando pipeta Pasteur. La muestra fue colocada en un portaobjetos y observada mediante microscopio óptico determinando así la fase del ciclo estral en que se encontraba la rata hembra cada día. En la figura 1 se muestra de forma representativa la citología de cada etapa del ciclo estral de la rata hembra, que consta de cuatro fases sucesivas: proestro, estro, metaestro y diestro. La fase de proestro se caracteriza por la presencia de gran cantidad de células epiteliales nucleadas (Figura 1A y 1B), en la fase de estro se aprecian grandes cantidades de células epiteliales queratinizadas a forma de placas o escamas cornificadas sin núcleo visible y se observan muy pocas células nucleadas (Figura 1C y 1D), la fase de metaestro se determina por la

observación de igual proporción de leucocitos, células queratinizadas y células epiteliales nucleadas (Figura 1E y 1F), mientras que la fase de diestro se caracteriza por la predominancia de leucocitos (Figura 1G y 1H, modificada de Marcondes et al., 2002).

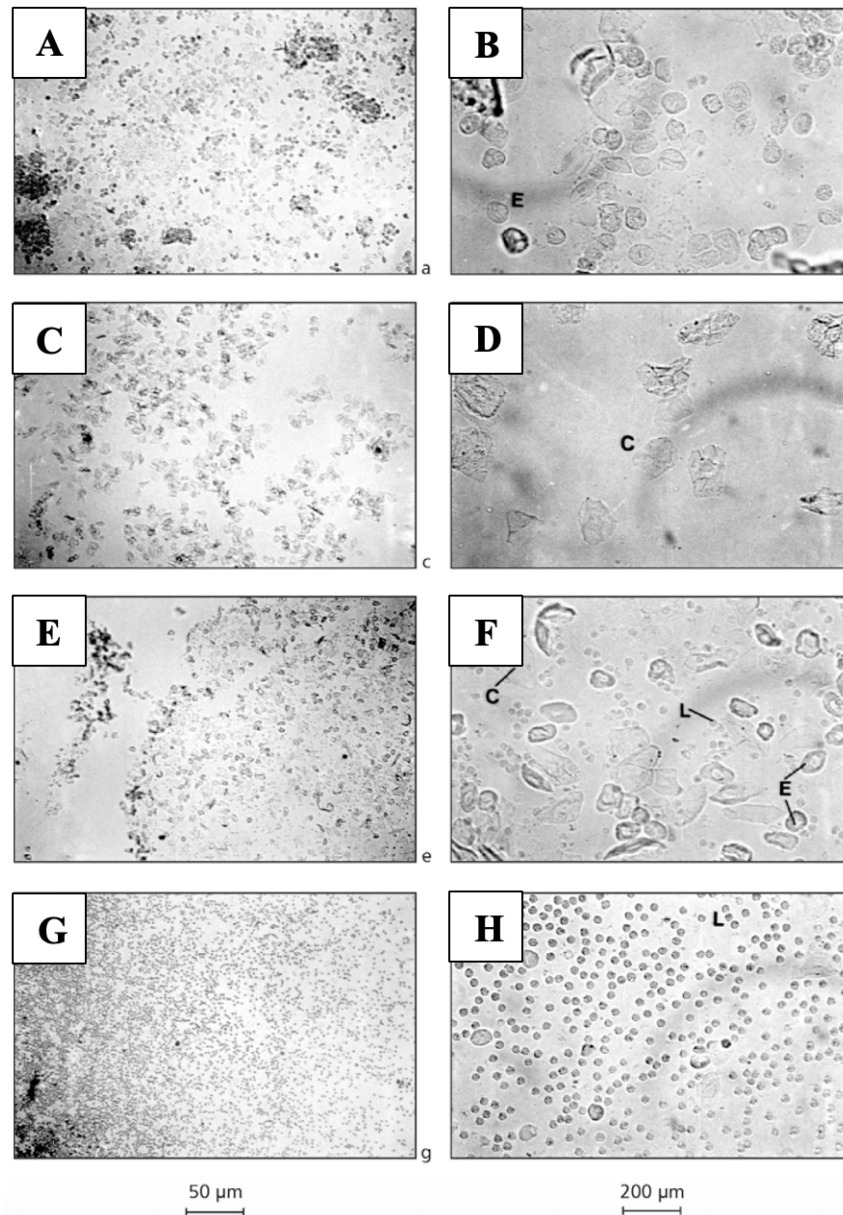


Figura 1. Microfotografías de la muestra obtenida por exudado vaginal en los distintos estadios del ciclo estral: proestro (A, B), estró (C, D), metaestro (E, F) y diestro (G, H). Se señalan los distintos tipos celulares: leucocitos (L), células epiteliales (E), y células queratinizadas (C). Extraída y modificada de Marcondes et al. (2022).

5.6. Obtención de muestras de plasma, tejido cerebral y LCR

Una vez finalizados los experimentos conductuales las ratas fueron anestesiadas con uretano (1.2 g/ml, i.p.) y posteriormente se procedió a la extracción del LCR. La misma se realizó mediante punción y aspiración directa en la cisterna magna utilizando una jeringa de 1 ml. De cada rata, fueron obtenidos entre 80 y 100 µl de LCR.

Inmediatamente después, los animales fueron sacrificados por decapitación y se colectaron muestras de sangre mediante *trunk-blood* en tubos que contenían el anticoagulante EDTA 0.1 M a pH de 8. Para obtener el plasma, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 4°C, por 15 minutos a 4000 g utilizando una centrífuga refrigerada (Thermo Scientific Heraeus Pico 21). Posteriormente a la obtención de la sangre, se disecó rápidamente el cerebro en hielo y se obtuvieron las muestras de ambos hipocampos. Todas las muestras obtenidas (LCR, plasma e hipocampo) fueron rotuladas y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento posterior.

5.7. Determinación de los niveles de citoquinas

Para la determinación de los niveles de citoquinas inflamatorias en las muestras de LCR, plasma e hipocampo se utilizó el Kit comercial LEGENDplex™ Rat Th Cytokine Panel V02 (BioLegend, número de lote B415104).

Este ensayo emplea perlas de poliestireno marcadas con anticuerpos específicos para cada citoquina de interés y el kit utilizado permitió la detección de 13 citoquinas: TNF- α , IL-10, IL-12p70, IL-1 β , IL-17-A, IL-18, IL-33, IL-1 α , IL-6, INF γ , CXCL1, MCP-1 y GM-CSF. La detección de las mismas se realizó mediante citometría de flujo en el equipo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) equipado con un autosampler, perteneciente a la Plataforma de Citometría de Flujo del Instituto Pasteur de Montevideo. Estos ensayos se realizaron en el marco de una pasantía PEDECIBA, realizada bajo la supervisión de la Dra. Mariela Bollati, jefa de la Unidad Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo y la Dra. Hellen Daghero, integrante de su grupo de investigación.

Las muestras de hipocampo obtenidas requirieron de un procesamiento previo para la obtención del sobrenadante de tejido. Los tejidos fueron colocados en un buffer de lisis (120 mg NaCl, 47.28 mg Tris, 150 μ L NP40 puro, 1500 μ L glicerol y 600 μ L de *cocktail* inhibidor de proteasas), sonicados y posteriormente centrifugados (4°C, 9000 g; 15 minutos). Se recogió el sobrenadante que fue alícuotado y almacenadas a -80°C hasta el momento de la cuantificación de citoquinas. Este procesamiento se realizó en el Departamento de Neurofarmacología Experimental del IIBCE.

La detección de las citoquinas en las muestras de plasma y LCR requirió una optimización previa que consistió en determinar tanto las diluciones como las condiciones óptimas del equipo para lograr los resultados.

El kit fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En placas de 96 pocillos con fondo en V se incubaron durante 2 horas las muestras de plasma,

sobrenadante de hipocampo y LCR junto con 25 μ L de buffer de ensayo y 25 μ L de la solución que contenía las perlas de poliestireno marcadas con anticuerpos específicos para cada citoquina. Para las muestras de plasma y de sobrenadantes de hipocampo se utilizó un factor de dilución de 1:4, mientras que las muestras de LCR se utilizaron sin diluir. Todos los estándares y muestras se sembraron por duplicado en las placas. Posteriormente se centrifugaron para permitir el descenso de las perlas en las placas. Se realizaron lavados con solución de lavado proporcionada por el kit y se agregó 25 μ L de solución de anticuerpos de detección dejando incubar durante 1 hora. Posteriormente se añadió estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) para el marcado de los complejos antígeno-anticuerpo formados. Finalmente, las muestras fueron re-suspendidas en buffer de ensayo y mediante citometría de flujo se midió la intensidad de fluorescencia emitida por los complejos antígeno-anticuerpo. Las mediciones fueron realizadas en un citómetro Attune™ NxT, el cual fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante, realizando el *startup*, limpieza y performance test antes de cada uso. La sensibilidad fue verificada mediante perlas de calibración. La tasa de eventos fue de 4000 eventos/s. Para el procesamiento de los eventos de fluorescencia generados por el complejo antígeno-anticuerpo, utilizamos el software LEGENDplex™ de BioLegend. Se generaron curvas estándar para posteriormente extrapolar las concentraciones de las 13 citoquinas en las muestras de plasma, hipocampo y LCR, las cuales fueron expresadas en pg/mL. Se obtuvo el coeficiente de variación de cada muestra sembrada por duplicado, que representa la dispersión relativa de la señal de fluorescencia respecto a su media y permite comparar la variabilidad de la muestra analizada. En la tabla 1 se muestra el coeficiente de variación promedio obtenido para cada tipo de muestra en cada etapa del modelo.

Etapas del modelo	Tipo de muestra	Coefficiente de variación (CV) promedio (%)
T30 (n=14)	Plasma	14.31
	Hipocampo	6.61
	LCR	10.06
T120 (n=23)	Plasma	12.87
	Hipocampo	11.42
	LCR	12.37

Tabla 1. Coeficiente de variación (CV, %) promedio obtenido en la medición de los niveles de citoquinas inflamatorias por citometría de flujo para cada tipo de muestra analizada en cada etapa del modelo.

5.8. Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Las gráficas y análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism 8*. Todos los datos fueron sometidos al test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk y posteriormente si la distribución fue normal se aplicó la prueba t- Student para muestras independientes o muestras pareadas, o en el caso de que no pasar el test de normalidad, se aplicó la prueba de Mann-Whitney. Para analizar el coeficiente d2 en el NORT se utilizó la prueba t de Student para una muestra, comparando con un valor hipotético de d2 de 0 (cero). La significancia estadística fue considerada con un $P \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados comportamentales

6.1.1. Desempeño en el NOR

La Figura 2 muestra la conducta de los animales durante la fase de habituación H1 y H2 al campo abierto. En la etapa temprana (T30) observamos que el número de cruces y de *groomings* fue similar durante las sesiones de habituación 1 y 2 en los animales administrados con LCRa (grupo control) así como en aquellos que recibieron STZ (Fig. 2A y 2C). Sin embargo, se evidenció una disminución significativa en el número de *rearings* en la H2 al comparar con la H1 en el grupo control y tratado con STZ (LCRa: $t=2.80$, $gl=7$, $p=0.0264$; STZ: $t=3.38$, $gl=5$, $p=0.0196$, Fig. 2B), indicativo de una adecuada habituación al campo abierto.

En la etapa tardía del modelo (T120), evidenciamos una reducción significativa en el número de cruces y de *rearings* en la sesión H2 únicamente en el grupo administrado con LCRa (número de cruces, LCRa: $t=2.69$, $gl=11$, $p=0.0200$, Fig 2D; *rearings*, LCRa: $t=2.97$, $gl=11$, $p=0.0127$, Fig 2E). No se observaron cambios en el número de *groomings* en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 2F). Los datos sugieren que a T120 los animales tratados con STZ no se habituaron al campo abierto.

Los resultados del análisis de los datos obtenidos en las fases de la habituación del NOR, sugieren que el desempeño de los animales en el NOR tanto a T30 como T120 no estaría influenciado por alteraciones en su actividad locomotora. Por otra parte, a T30 existe una adecuada habituación al campo abierto de ambos grupos (controles y tratados), mientras que a T120 los animales tratados no habituaron al campo abierto.

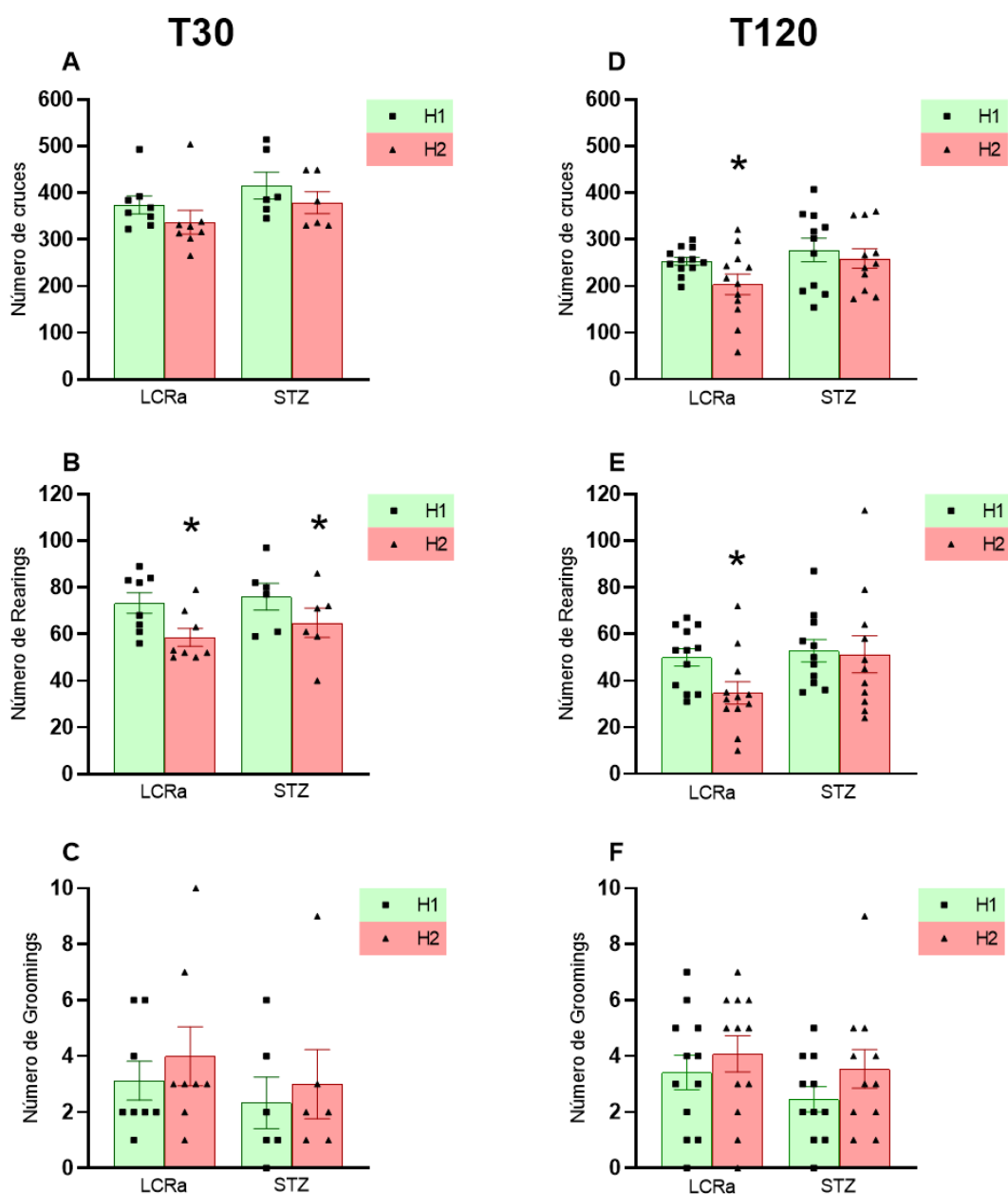


Figura 2. Número de cruces (A, D), *rearings* (B, E) y *groomings* (C, F) durante las sesiones de habituación 1 (H1) y 2 (H2) del NOR en hembras evaluadas 30 (A, B, C) o 120 días (D, E, F) luego de la administración i.c.v. de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. T30 N=6-8; T120 N=11-12. Test *t*-student. * $P \leq 0.05$.

La Figura 3 muestra el tiempo de exploración de los objetos durante el ensayo de muestra en el NOR. No se observaron diferencias significativas en el tiempo de exploración de ambos objetos en el grupo control ni en los animales tratados con STZ en ambas etapas del modelo (Fig. 3A y 3B), sugiriendo que no existe preferencia de exploración por ninguno de los objetos idénticos presentados en esta etapa del ensayo. Además, teniendo en cuenta que se varió la posición de los objetos en el ensayo de muestra entre los animales, podemos descartar preferencias por la posición de los objetos en el campo abierto en un determinado lugar o esquina.

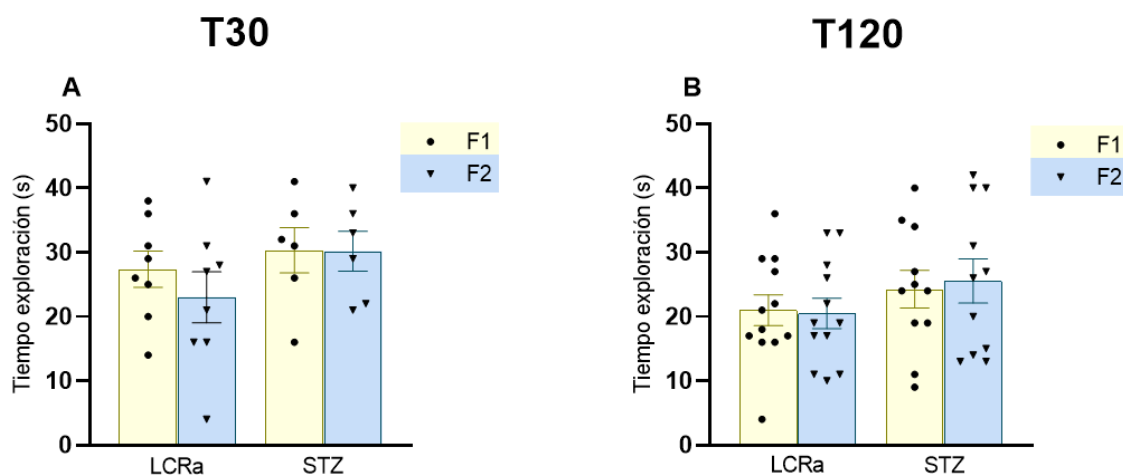


Figura 3. Tiempo total de exploración de los objetos familiares (F1 y F2) durante el ensayo de muestra del NOR en hembras evaluadas 30 (A) o 120 días (B) luego de la administración i.c.v. de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. T30 N=6-8; T120 N=11-12. Test *t*-student.

La Figura 4 muestra el tiempo de exploración y el índice de discriminación en el NOR en el día del ensayo de retención. En la etapa temprana T30, observamos que el tiempo de exploración del objeto novedoso fue significativamente mayor en comparación al tiempo de exploración del objeto familiar en el grupo control ($t=3.22$, $gl=7$, $p=0.0147$, Fig. 4A). Sin embargo, en el grupo tratado con STZ los tiempos de exploración del objeto familiar y novedoso fueron similares ($t=1.28$, $gl=5$, $p=n.s.$, Fig. 4A). De acuerdo con estos parámetros, observamos que el índice de discriminación $d2$ fue significativamente mayor a cero en el grupo control ($t=3.55$, $gl=7$, $p=0.0093$, Fig. 4B), mientras que en el grupo tratado con STZ el índice $d2$ no se diferenció significativamente de cero ($t=1.13$, $gl=5$, $p=n.s.$, Fig. 4B).

En T120, observamos que el tiempo de exploración del objeto novedoso fue significativamente mayor en comparación al objeto familiar en el grupo control ($t=2.33$, $gl=11$, $p=0.0398$, Fig. 4C). Sin embargo, los animales tratados con STZ exploraron de forma similar ambos objetos ($t=0.26$, $gl=10$, $p=n.s.$, Fig. 4C). Así, el índice de discriminación $d2$ para el grupo control se diferenció de forma significativa de cero ($t=2.83$, $gl=11$, $p=0.0161$, Fig. 4D) mientras que en el grupo STZ no se diferenció significativamente de cero ($t=0.03$, $gl=10$, $p=n.s.$, Fig. 4D).

Los resultados sugieren que la administración i.c.v. de STZ en hembras induce alteraciones cognitivas relacionadas con la memoria de reconocimiento, que aparecen tempranamente, a los 30 días post-STZ.

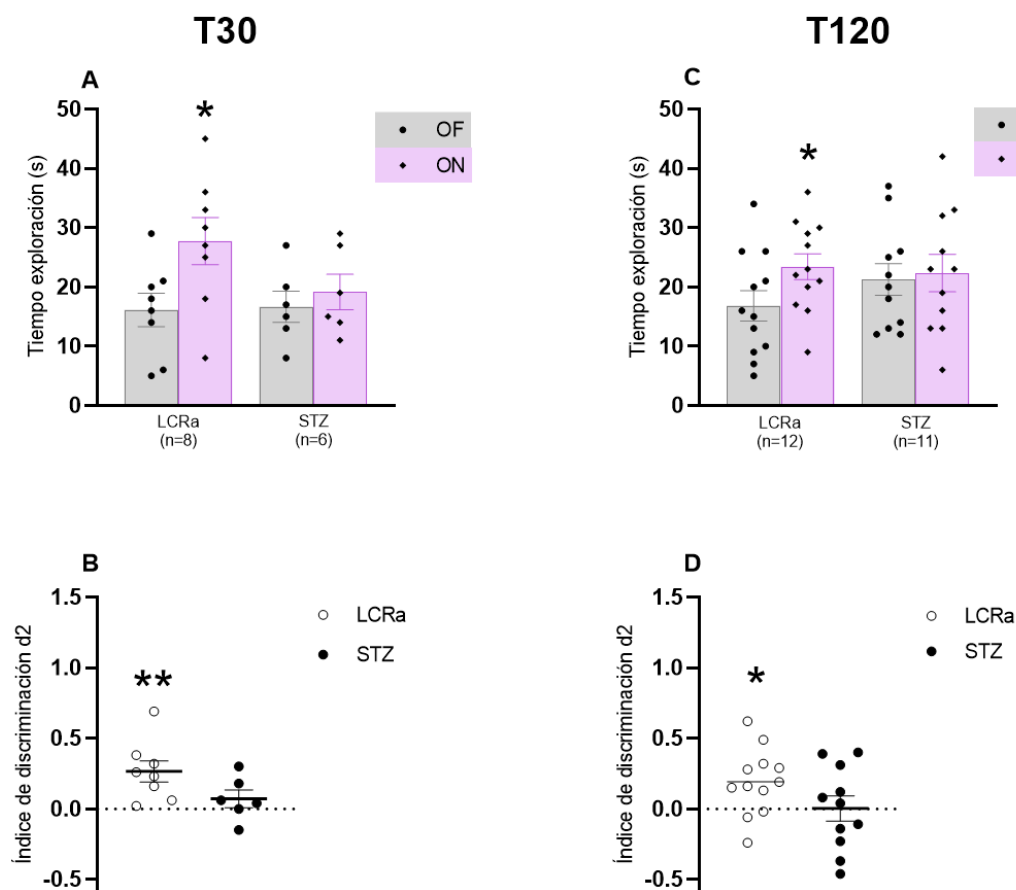


Figura 4. Tiempo total de exploración del objeto familiar (OF) y novedoso (ON) e índice de discriminación D2 durante el ensayo de retención del NOR en hembras evaluadas 30 (A, B) o 120 días (C, D) luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ Media + EEM. T30 N=6-8, T120 N=11-12. Test de t-student. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

6.1.2. Desempeño en el TNF

La Figura 5 muestra el efecto de la administración de STZ sobre la conducta de los animales en el TNF evaluado en las dos etapas: T30 y T120.

En la etapa temprana, no se evidenciaron diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros analizados: *climbing*, nado o inmovilidad al comparar los tiempos de permanencia en cada conducta entre el grupo control y el grupo tratado con STZ (Fig. 5A).

En la etapa tardía, evidenciamos un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad en el grupo tratado con STZ en comparación con el grupo control ($t=3.08$, $gl=21$, $p=0.0056$, Fig. 5B) y una reducción significativa en el tiempo de *climbing* ($t=2.35$, $gl=21$, $p=0.0287$, Fig. 5B). No se observaron diferencias significativas en el tiempo de nado (Fig. 5B).

Los resultados de este ensayo muestran la aparición de un perfil conductual de tipo-depresivo en la etapa tardía en el grupo tratado con STZ comparado con su control.

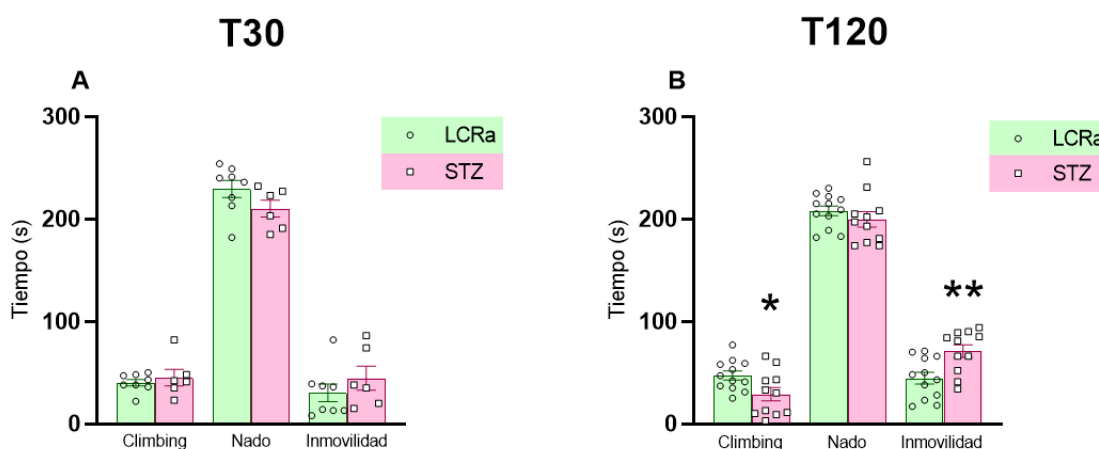


Figura 5. Tiempo de permanencia en las conductas de *climbing*, nado e inmovilidad en el TNF en hembras evaluadas 30 (A) o 120 días (B) luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ Media + EEM. T30 N=6-8, T120 N=11-12. Test de t-student. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

6.2. Cuantificación de los niveles de citoquinas inflamatorias por citometría de flujo

En las figuras 6 a la 13 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de las citoquinas en todos los grupos experimentales, separados por tipo de muestra analizada: plasma, sobrenadante de hipocampo y LCR. Se muestran resultados de trece citoquinas para plasma y sobrenadante de hipocampo en tanto que para las muestras de LCR se muestran nueve citoquinas dado que no se detectaron niveles significativos de IFN- γ , GM-CSF en T30 ni en T120. Si bien se detectó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IL-18 e IL-33 en LCR a T120, muchas de las muestras ensayadas no tuvieron valores detectables por este sistema de detección.

En las muestras de plasma, en T30 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ninguna de las citoquinas inflamatorias analizadas en los animales tratados con STZ respecto al grupo control (Fig. 6). Fue observada una tendencia a la disminución en los niveles de IFN- γ y de IL-12p70 en el grupo tratado respecto al grupo control (IFN- γ : Mann-Whitney U=12, $p=0.08$; IL-12p70: Mann-Whitney U=11, $p=0.08$; Fig. 6 C, H).

En las muestras de plasma obtenidas en T120, evidenciamos una disminución estadísticamente significativa de IL-1 α en los animales tratados con STZ en comparación con los animales control (Mann-Whitney U=31, $p=0.0308$, Fig. 7L). El resto de las

citoquinas analizadas no presentó diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en esta etapa (Fig. 7).

Se realizó la comparación entre los niveles de las distintas citoquinas en las muestras de plasma de los animales de T30 y T120 y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales controles de ambas etapas, lo cual pone en evidencia que a pesar de las diferencias en edades (3 meses de edad para los animales ensayados a T30 y 6 meses de edad para los animales ensayados a T120), estos parámetros se mantienen en ambos grupos. Este análisis demuestra la reproducibilidad en la obtención y procesamiento de las muestras así como del sistema de detección.

Por otra parte, en las muestras de hipocampo, en T30 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citoquinas inflamatorias en animales inyectados con STZ respecto al grupo control (Fig. 8). Sin embargo, de forma interesante, en la etapa tardía T120 observamos una disminución de los niveles de IL1- β en los animales tratados en comparación con los animales control (Mann-Whitney U=17, p=0.0017; Fig. 9 I). El resto de las citoquinas analizadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en esta etapa (Fig. 9).

También realizamos la comparación entre los niveles de citoquinas en los animales controles de ambos grupos, T30 y T120, y observamos que, en el hipocampo, existe un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IL-12p70 (t=2.22, gl=18, p=0.0388; Fig. 10H) e IL-1 β (t=2.93, gl=18, p=0.0089; Fig. 10 I) en las muestras obtenidas de animales controles de T120 respecto a T30. Este resultado sugiere que existiría mayor inflamación en hipocampo con el envejecimiento.

Por último, al analizar las muestras de LCR de ambos grupos experimentales, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citoquinas en animales inyectados con STZ respecto al grupo control en la etapa temprana T30 (Fig. 11). Sin embargo, en la etapa tardía T120 (Fig. 12), los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de varias de las citoquinas analizadas en los animales inyectados con STZ en comparación con los animales control. Dichas citoquinas fueron: TNF- α (t=2.61, gl=21, p=0.0160, Fig. 12A), IL-10 (t=2.82, gl=21, p=0.0102, Fig. 12B), IL-12p70 (Mann-Whitney U=24, p=0.0086, Fig. 12E), IL1- β (Mann-Whitney U=15, p=0.0010, Fig. 12F), IL17-A (Mann-Whitney U=7, p=<0,0001, Fig. 12G), IL-1 α (Mann-Whitney U=23, p=0.0070, Fig. 12H) e IL-6 (t=3.16, gl=21, p=0.0047, Fig. 12 I).

Los niveles de INF γ , CXCL1, MCP-1 y GM-CSF no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. También realizamos la comparación

entre los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias en animales control de la etapa temprana T30 y tardía T120 y observamos que, en las muestras de LCR, existe un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IL-12p70 ($t=2.12$, $gl=18$, $p=0.0481$; Fig. 13E), IL-1 β ($t=2.72$, $gl=18$, $p=0.0138$; Fig. 13F), IL-1 α ($t=3.24$, $gl=18$, $p=0.0045$; Fig. 13H) e IL-6 ($t=3.86$, $gl=18$, $p=0.0011$; Fig. 13I) en la etapa tardía respecto a la etapa temprana.

T30 PLASMA

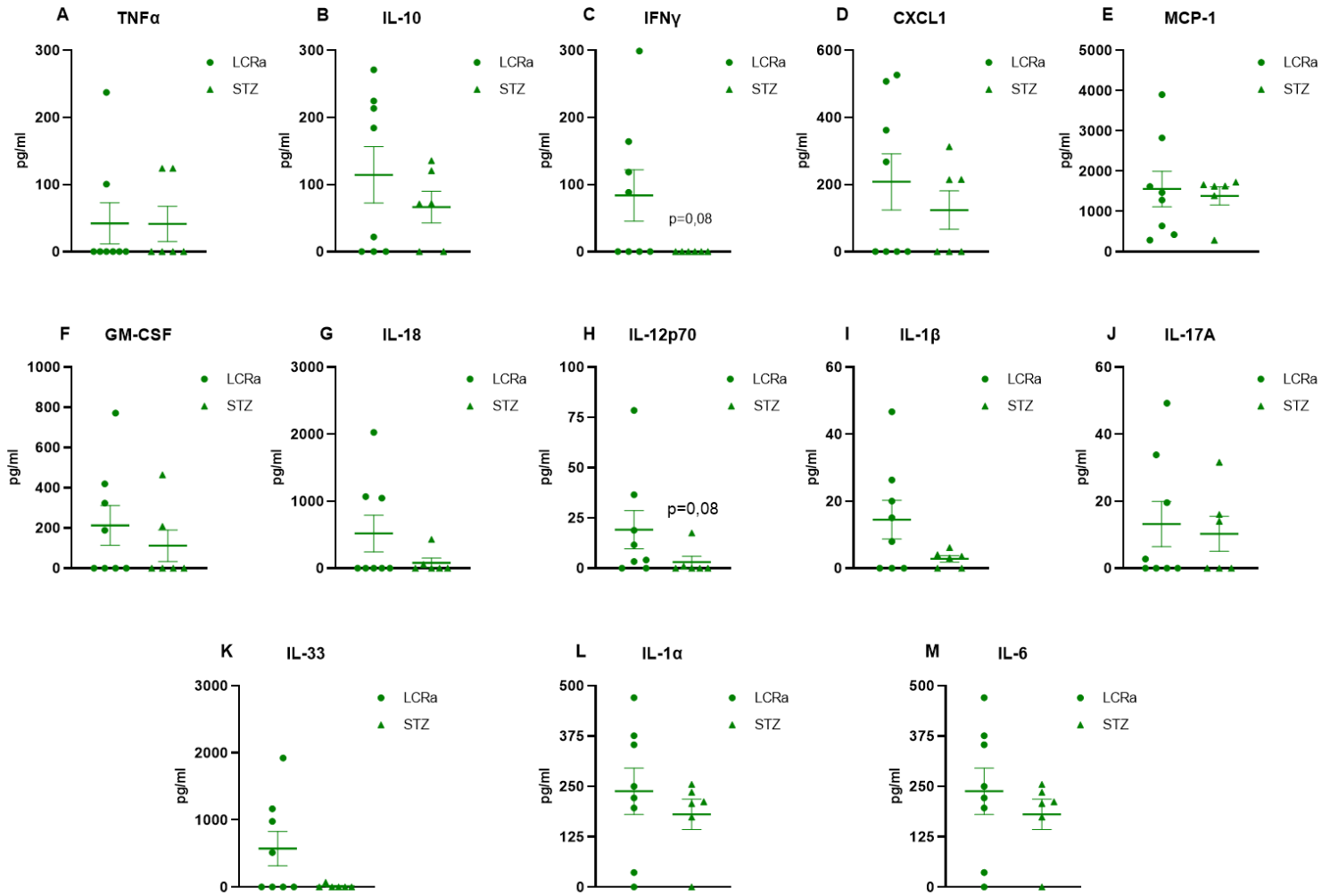


Figura 6. Niveles de Citoquinas en Plasma a T30. (A-M). Niveles de las citoquinas TNF- α , IL-10, IFN γ , CXCL1, MCP-1, GM-CSF, IL-18, IL-12p70, IL1- β , IL-17A, IL-33, IL-1 α e IL-6 en plasma 30 días luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. N=6-8.

T120 PLASMA

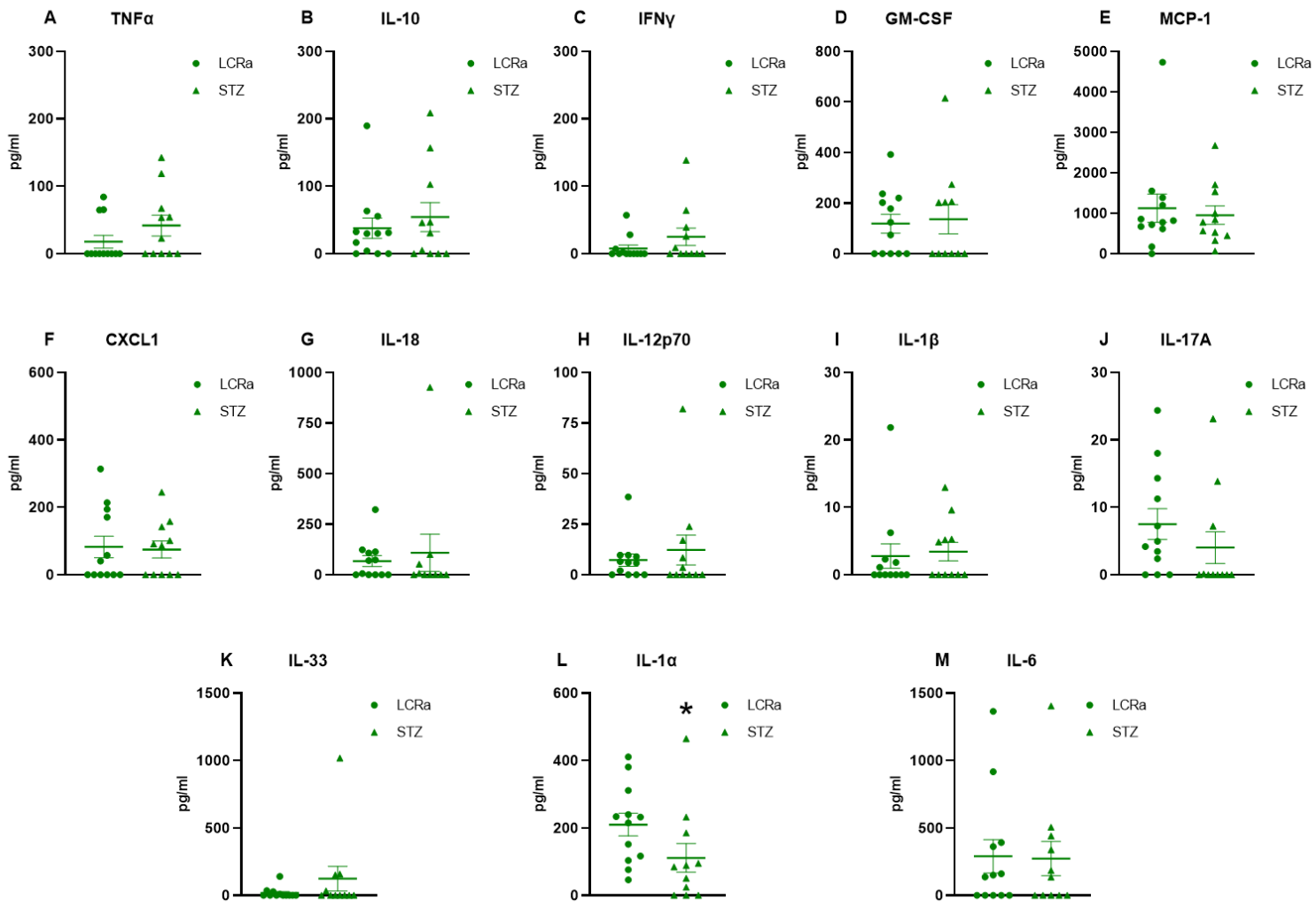


Figura 7. Niveles de Citoquinas en Plasma a T120. (A-M). Niveles de citoquinas TNF- α , IL-10, IFN γ , CXCL1, MCP-1, GM-CSF, IL-18, IL-12p70, IL-1 β , IL-17A, IL-33, IL-1 α e IL-6 en hipocampo 120 días luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. N=11-12. Test de student. *P $\leq$ 0.05.

T30 HIPOCAMPO

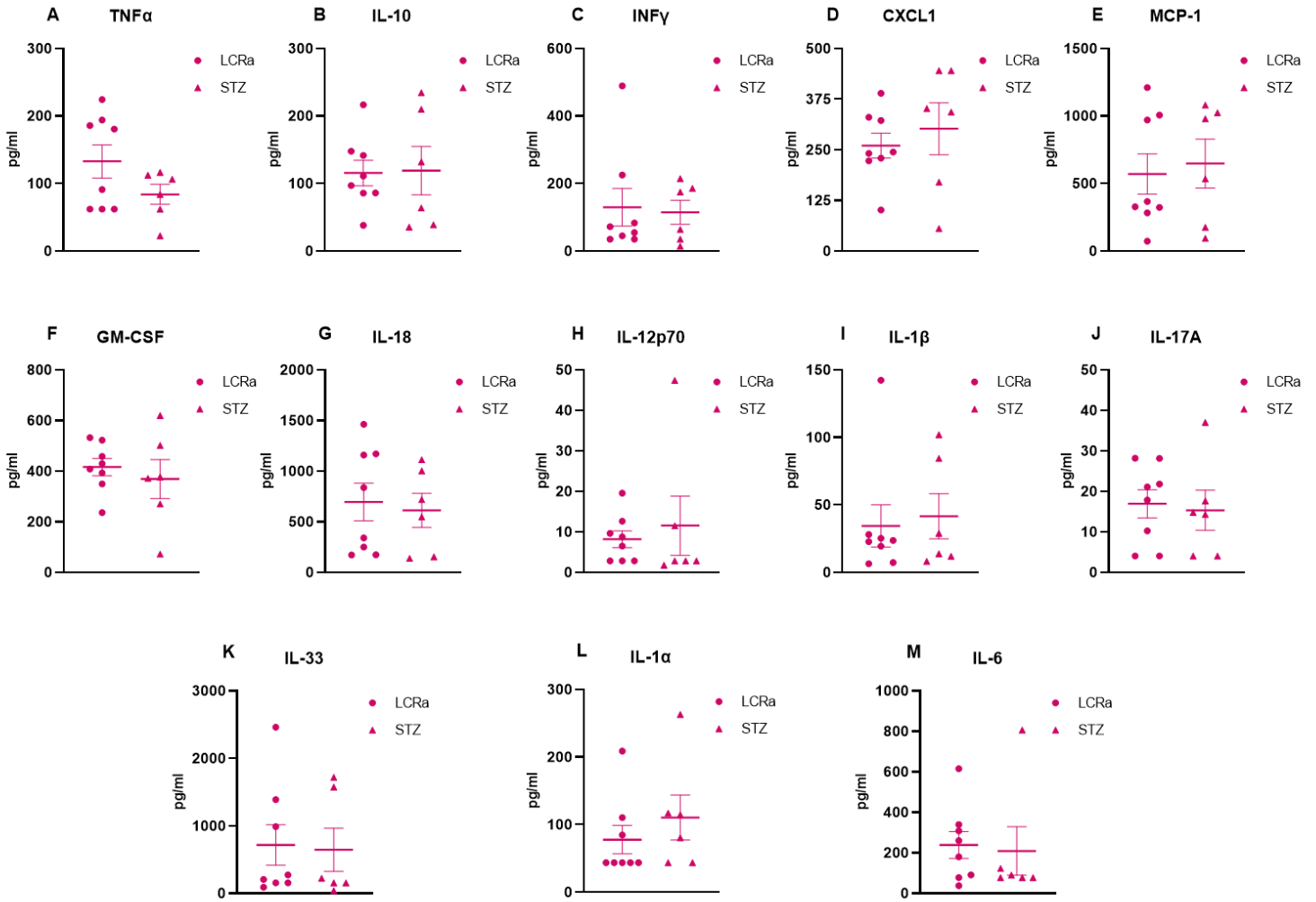


Figura 8. Niveles de Citoquinas en Hipocampo a T30. (A-M). Niveles de las citoquinas TNF- α , IL-10, INF γ , CXCL1, MCP-1, GM-CSF, IL-18, IL-12p70, IL1- β , IL-17A, IL-33, IL-1 α e IL-6 en hipocampo 30 días luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. N=6-8.

T120 HIPOCAMPO

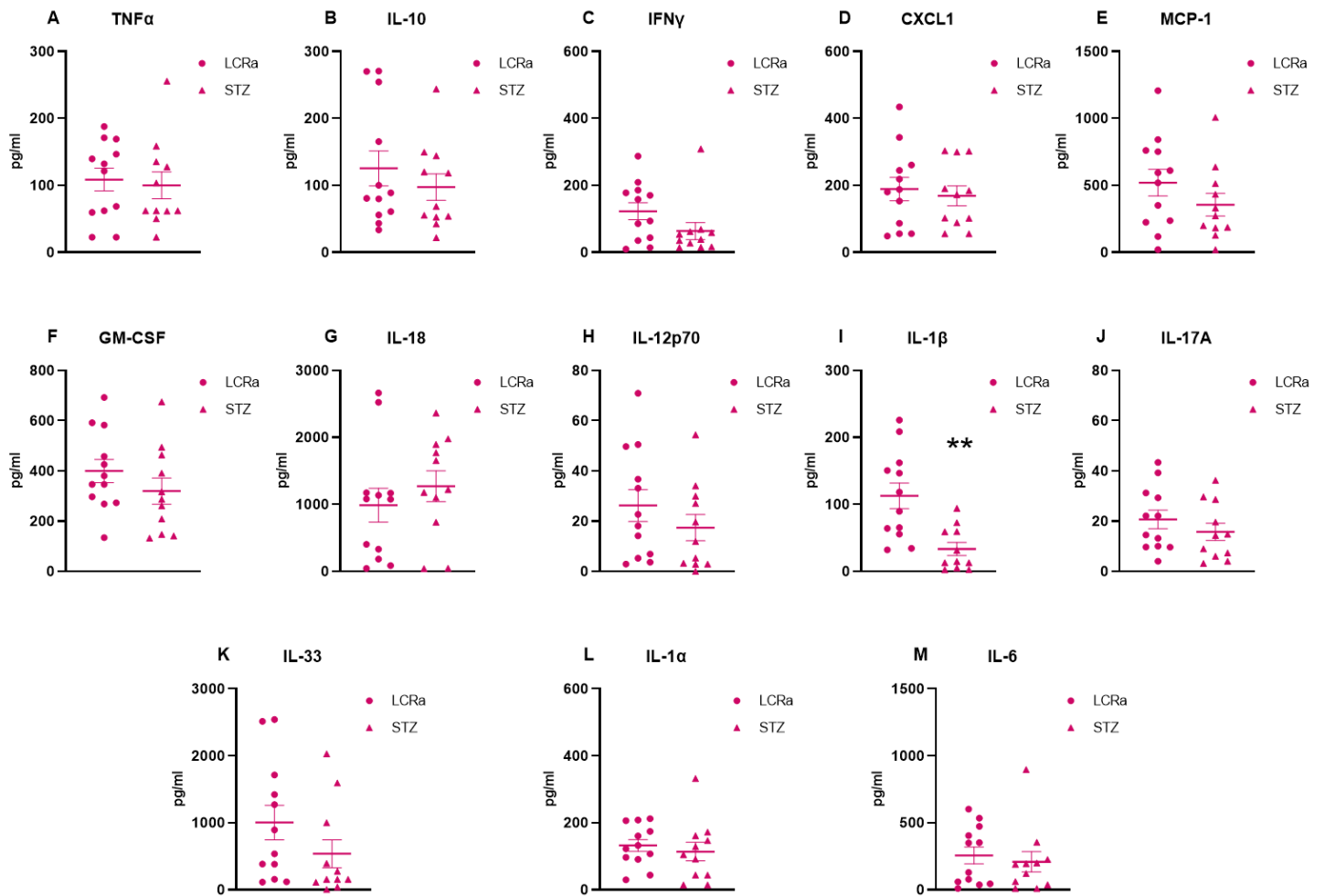


Figura 9. Niveles de Citoquinas en Hipocampo a T120. (A-M). Niveles de las citoquinas TNF- α , IL-10, IFN γ , CXCL1, MCP-1, GM-CSF, IL-18, IL-12p70, IL1- β , IL-17A, IL-33, IL-1 α e IL-6 en hipocampo 120 días luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. N=11-12. Test de Mann-Whitney. **P $\leq$ 0.01.

GRUPOS CONTROL HIPOCAMPO

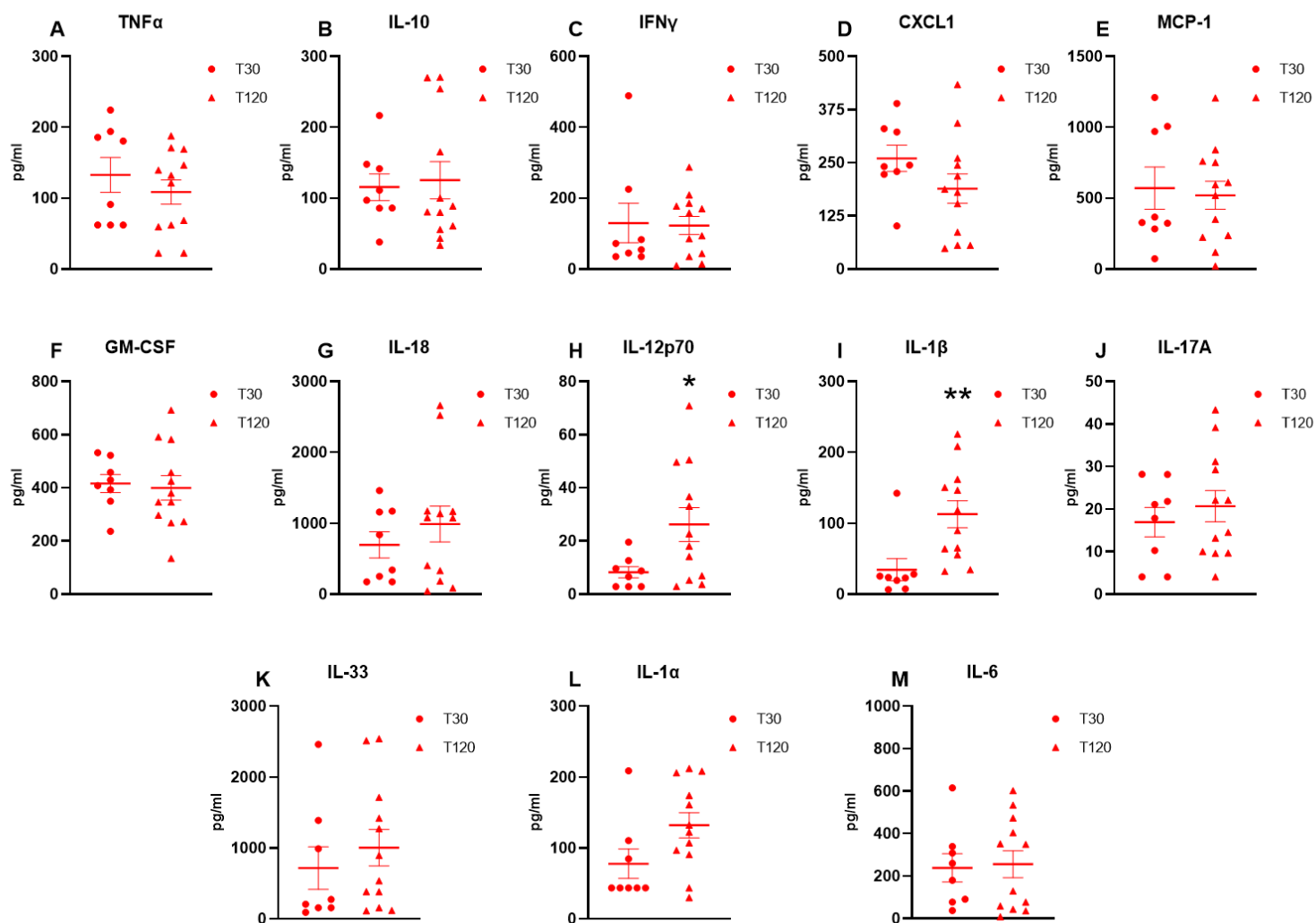


Figura 10. Niveles de citoquinas en Hipocampo en los grupos control a T30 y T120. (A-M). TNF- α , IL-10, IFN γ , CXCL1, MCP-1, GM-CSF, IL-18, IL-12p70, IL-1 β , IL-17A, IL-33, IL-1 α e IL-6 en hipocampo 30 o 120 días luego de la administración i.c.v de LCRa. Media $\pm$ EEM. N=8-12. Test de student o Test de Mann-Whitney. * $P \leq 0.05$. ** $P \leq 0.01$.

T30 LCR

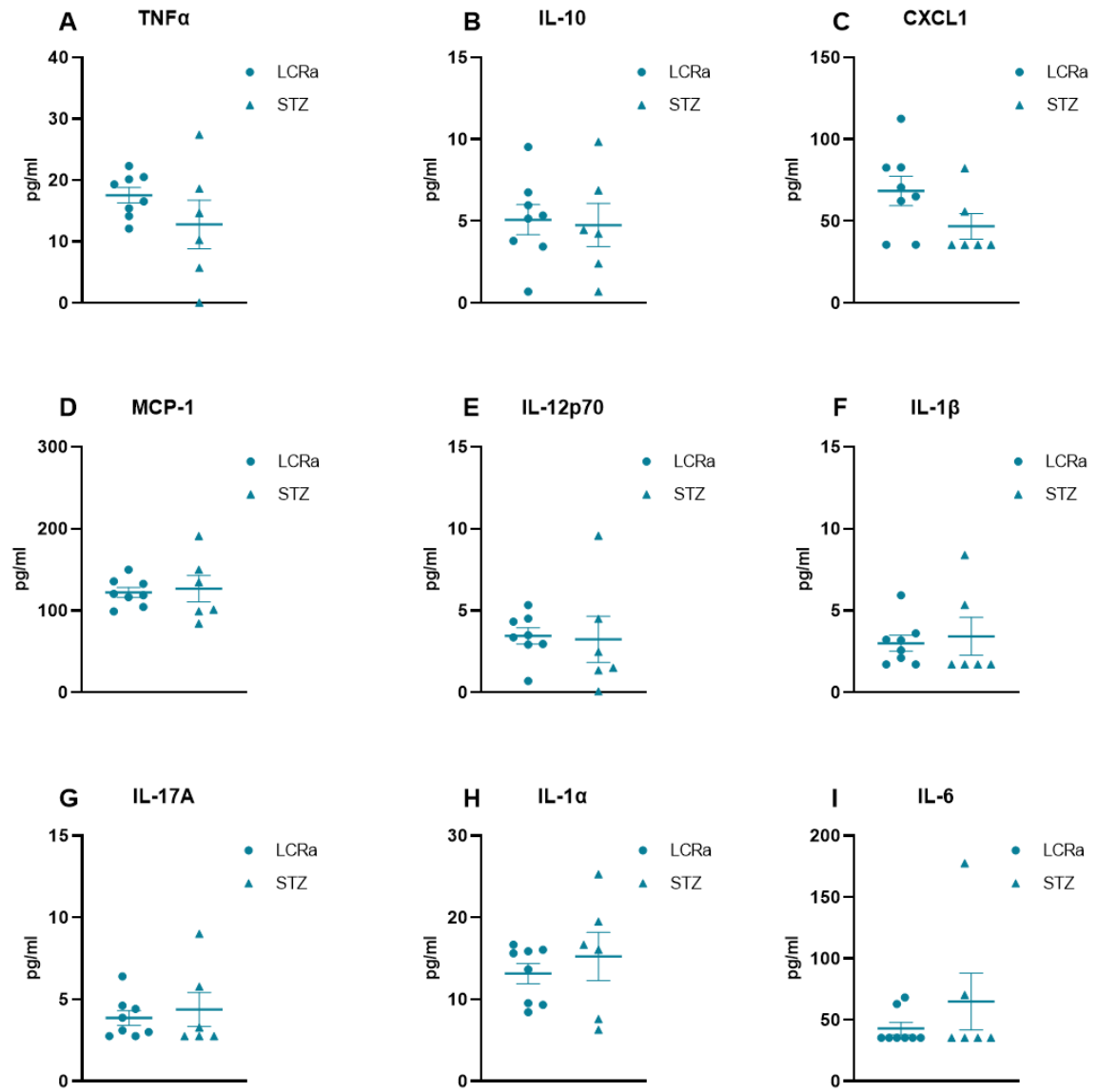


Figura 11. Niveles de Citoquinas en LCR a T30. (A-I). Niveles de las citoquinas TNF- α , IL-10, CXCL1, MCP-1, IL-12p70, IL-1 β , IL-17A, IL-1 α e IL-6 en LCR 30 días luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. N=6-8.

T120 LCR

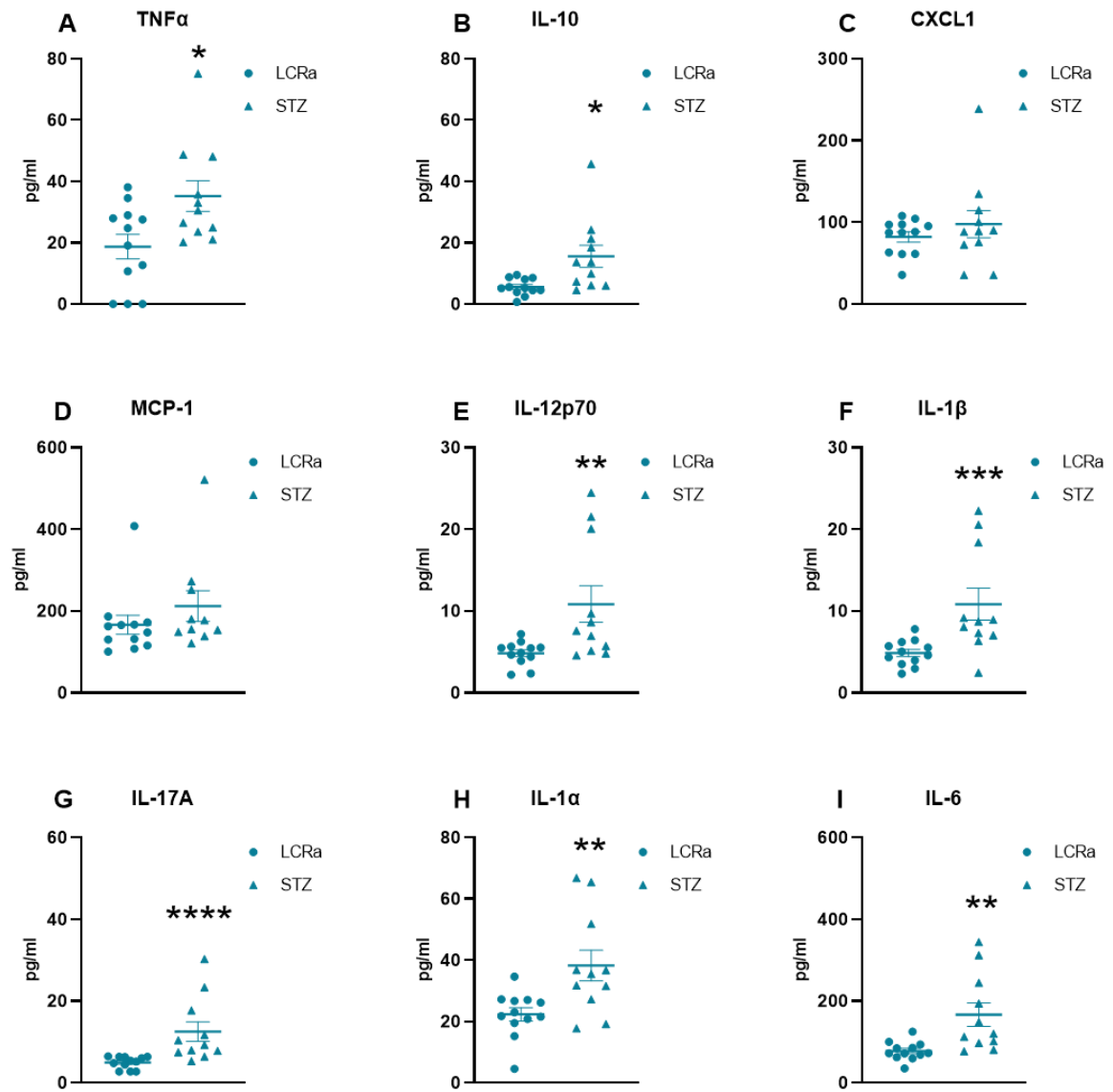


Figura 12. Niveles de Citoquinas en LCR a T120. (A-I). Niveles de las citoquinas TNF- α , IL-10, CXCL1, MCP-1, IL-12p70, IL-1 β , IL-17A, IL-1 α e IL-6 en LCR 120 días luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ. Media $\pm$ EEM. N=11-12. Test de student o test de Mann-Whitney. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

GRUPOS CONTROL LCR

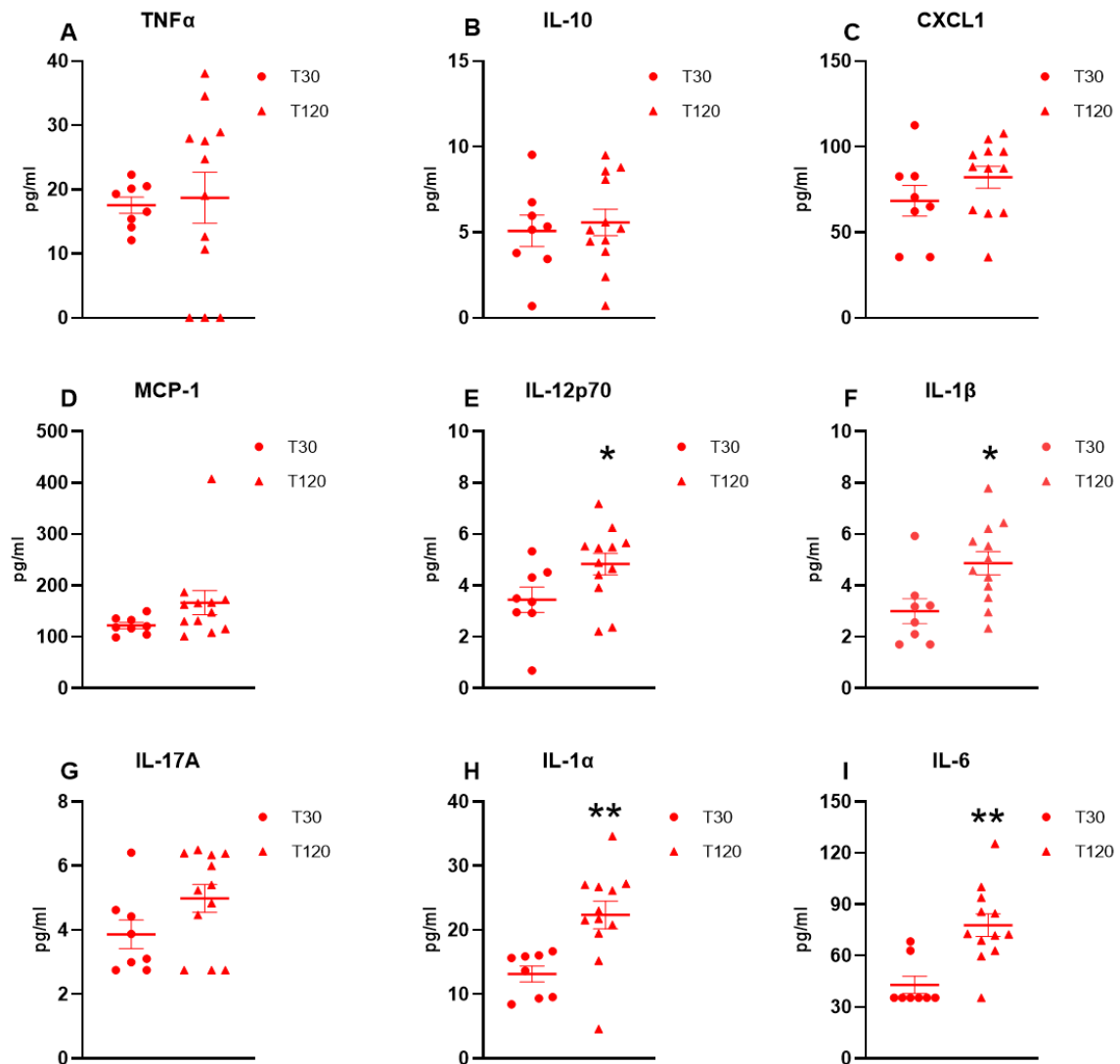


Figura 13. Niveles de Citoquinas en LCR en los grupos control a T30 y T120. (A-I). Niveles de las citoquinas TNF- α , IL-10, CXCL1, MCP-1, IL-12p70, IL-1 β , IL-17A, IL-1 α e IL-6 en LCR 30 o 120 días luego de la administración i.c.v de LCRa. Media $\pm$ EEM. N=8-12. Test de student o test de Mann-Whitney. *P<0.05, **P<0.01.

6.3. Evaluación de las etapas del ciclo estral

La figura 14 muestra la distribución de las fases del ciclo estral de las hembras en cada uno de los días en que se realizaron las etapas de ambos ensayos comportamentales. En el caso de las hembras evaluadas en T30, no observamos una distribución predominante en ninguna etapa del ciclo en ninguno de los momentos del experimento tanto en el grupo control como en el tratado con STZ (Fig. 14 A, C, E, G, I).

En la etapa tardía T120 observamos una predominancia de hembras en la fase de estro durante el ensayo de muestra y de retención, aunque esto sucedió de manera similar en el grupo control así como en el tratado con STZ (Fig. 14 F, H). El día de realización

del TNF, observamos una predominancia de hembras en la fase de diestro en el grupo control mientras que hubo una predominancia de hembras en la fase de estro en el grupo STZ (Fig. 14 J).

La similar distribución observada en el grupo control y tratado en las distintas fases del ciclo estral sugiere que las diferencias observadas en el desempeño cognitivo en el NOR y la presencia de conductas de tipo-depresivas en el TNF no estarían determinados por la fase del ciclo estral en la que estuvieran las ratas al momento del ensayo.

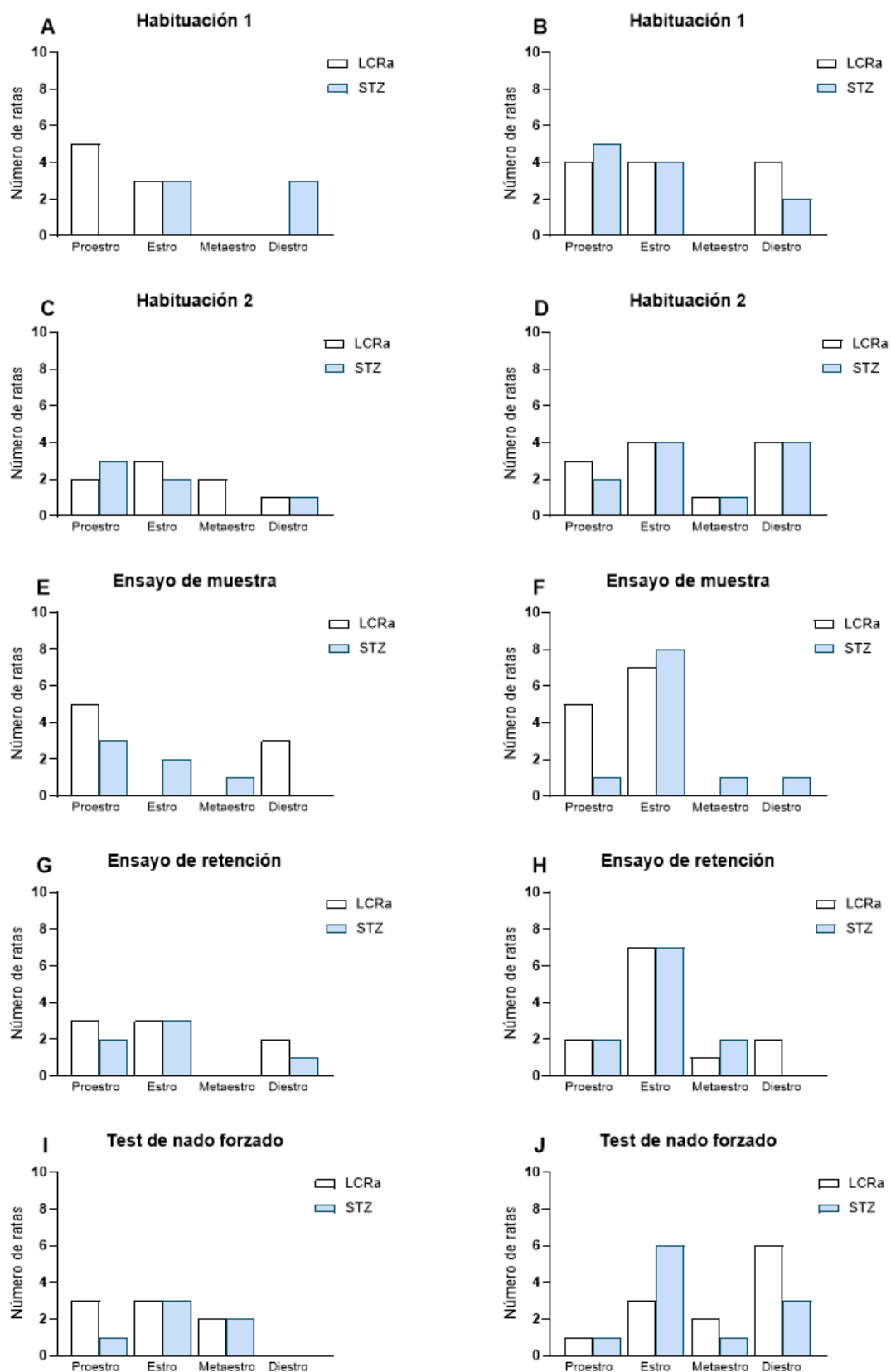


Figura 14. Histograma de frecuencia de la fase del ciclo estral de las hembras durante los ensayos conductuales en el ensayo de retención del **NOR** (A-H) y el **TNF** (I,J) en el grupo experimental de 30 (T30; A,C,E,G,I) o 120 días (T120; B,D,F,H,J) luego de la administración i.c.v de LCRa o STZ.

7. DISCUSIÓN

En la presente Tesis de Maestría se caracterizó la presencia de alteraciones en la memoria de reconocimiento en ratas hembras en dos etapas del modelo de EA esporádico inducido por STZ, la coexistencia de conductas de tipo-depresivas y su correlación con niveles de citoquinas inflamatorias a nivel sistémico y central. También se evaluó la relación entre el desempeño en los ensayos conductuales y la fase del ciclo estral en que estaban las hembras durante dichos ensayos.

7.1. Las alteraciones en la memoria en hembras se manifiestan desde la etapa temprana y se mantienen en la etapa tardía

En el contexto de esta tesis logramos optimizar el protocolo experimental para la evaluación de ratas hembras en el NOR en nuestro laboratorio.

La manipulación y exposición de las ratas hembras al campo abierto demostró un perfil conductual más ansioso evidenciado como una reducción en el número de cruces por la parte central del campo abierto en comparación con nuestros antecedentes en ratas macho. Como estrategia para resolver este aspecto que podría dar lugar a dificultades en la realización de NOR e interpretación de resultados se aumentó la cantidad de sesiones previas de *handling* y se optimizaron de condiciones de luz-oscuridad, temperatura y tiempo de duración de cada sesión, logrando poner a punto este ensayo en ratas hembras Sprague Dawley para obtener resultados confiables y reproducibles.

Los resultados del ensayo de retención del NOR en hembras tratadas con STZ i.c.v., mostraron tiempos de exploración similares del objeto familiar y novedoso, al compararlos con ratas control. El índice d2 fue cercano a cero, lo cual es indicativo de un déficit de memoria, y de forma interesante, se manifiesta desde la etapa temprana y se mantiene en la etapa tardía.

Este resultado va en línea con la hipótesis planteada y difiere con los antecedentes de nuestro grupo en ratas macho, donde los déficits cognitivos inducidos por la administración de STZ aparecen en etapas posteriores, a partir de los 60 días post-STZ (Niño-Rivero et al., 2025), por lo tanto, destacamos que en el modelo de EA esporádica inducida por STZ, el déficit en la memoria de reconocimiento en hembras aparece en etapas más tempranas que en machos.

Considerando que la gran mayoría de los estudios realizados utilizando el modelo de EA esporádico inducido por STZ han sido realizados en ratas macho (León-Arcia et al., 2025), los resultados de la presente tesis logran avanzar en la caracterización del curso

temporal de los déficits cognitivos, relacionados con la memoria de reconocimiento, en ratas hembra en un modelo de EA esporádico.

A pesar de que la EA de tipo esporádica representa el 95% de los casos de EA en humanos, la mayoría de la evidencia disponible realizada en modelos preclínicos ha sido utilizando modelos de EA de tipo familiar, utilizando modelos animales de ratas o ratones machos y hembras transgénicas para EA, que representan menos del 5% de los casos en humanos (LaFerla y Green, 2012). Estos modelos, desarrollados principalmente en ratones y ratas portadores de mutaciones en APP, PS1 o PS2, han sido fundamentales para comprender algunos de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la EA, como los mecanismos de neurodegeneración relacionados con el depósito extracelular del péptido A β , aunque presentan limitaciones en la traslación de los resultados a la EA esporádica, particularmente en lo que refiere al envejecimiento y los factores metabólicos o inflamatorios (Onos et al., 2016). La evidencia disponible en estos modelos transgénicos no es concluyente, mostrando distintos resultados respecto al desarrollo del déficit cognitivo y las diferencias entre sexos. Mientras que algunos de los trabajos observan la aparición de deterioro cognitivo de forma más temprana en machos que en hembras, adjudicando un efecto protector de los estrógenos en hembras jóvenes que evitaría la aparición de déficits cognitivos a joven edad (Kommaddi et al., 2023), otros estudios evidencian, al igual que nuestros resultados, una aparición más temprana del déficit cognitivo en hembras con una progresión más rápida y severa (Hirata-Fukae et al., 2008; Kolahchi et al., 2024).

Sin embargo, en la EA de tipo esporádica en hombres y mujeres la edad de presentación suele ser más tardía en comparación con la EA de tipo familiar, y posiblemente los mecanismos que subyacen las diferencias entre sexos difieran en la EA de tipo familiar de inicio temprano y la EA esporádica, siendo fundamental avanzar en la comprensión de otros mecanismos involucrados. En este sentido, nuestros resultados están en línea con lo evidenciado en estudios en pacientes mujeres con EA, que si bien la evidencia no es concluyente, han observado que en las fases tempranas de la EA, las mujeres presentarían una evolución clínica más rápida, con un descenso más pronunciado en las escalas de valoración cognitiva tales como *Mini-Mental State Examination*, en comparación con los hombres (Filon et al., 2016; Rosende-Roca et al., 2025).

7.2. Las conductas de tipo-depresivas se evidenciaron en la etapa tardía y no en la temprana

El TNF permitió evaluar la presencia de conductas de tipo-depresivas en nuestro modelo. En este sentido, se ha descrito la sensibilidad de este ensayo para evidenciar respuestas comportamentales pro-depresivas, evidenciadas por un aumento en la inmovilidad y disminución del nado y/o escalamiento (Temel et al., 2007; Lagos et al., 2009; Urbanavicius et al., 2014; 2019).

Los resultados del TNF en la etapa tardía del modelo de EA inducido por STZ en hembras, muestran un aumento en el tiempo de inmovilidad a expensas de una disminución en el tiempo de *climbing*, compatible con la aparición de un perfil conductual de tipo-depresivo en dicho grupo experimental. Esto no se observó en la etapa temprana del modelo, sugiriendo que la probable comorbilidad entre la EA y depresión se da en etapas más tardías de la enfermedad.

Este resultado se contradice con nuestra hipótesis y con lo reportado previamente en la literatura, que establece que la depresión se manifiesta como un síntoma temprano de la EA, y que también es un factor de riesgo para el desarrollo de la misma (Hayley et al., 2021; Elser et al., 2023; Petkus et al., 2024), por lo cual sería esperable encontrarlo desde etapas tempranas.

Es de destacar que a diferencia de los déficit cognitivos relacionados a la memoria de reconocimiento, que fueron evaluados mediante el NOR, ensayo que ha sido previamente utilizado en el modelo de EA esporádica inducido por STZ en distintas etapas en nuestro grupo en ratas macho, esta es la primera vez que evaluamos conductas de tipo-depresivas mediante el TNF en este modelo en ratas hembras en nuestro laboratorio. Si bien está establecido que es una prueba con buena validez de constructo, sensible a la presencia de conductas de tipo-depresivas, también existen otros posibles ensayos conductuales para evaluarlas que podrían detectar alteraciones desde etapas más tempranas, como la prueba de preferencia de sacarosa (Hao et al., 2019).

Existe poco consenso acerca del curso natural de la depresión en la EA, lo cual se explicaría debido a la fluctuación de los síntomas depresivos y a la heterogeneidad en metodologías de investigación empleadas (Chi et al., 2014). Asimismo, se ha planteado una relación bidireccional entre la EA y la depresión, sugiriendo que los trastornos depresivos también pueden surgir posteriormente, en respuesta al deterioro cognitivo debido a la EA (Chen et al., 2024), siendo ésta otra de las posibilidades que surgiría de nuestros resultados.

Respecto a las diferencias entre sexos, existe evidencia creciente tanto en modelos preclínicos como clínicos de que tanto la depresión como la EA presentan una mayor prevalencia y severidad en mujeres y en ratas hembra (Chen et al., 2024).

En modelos animales de EA, particularmente en ratas hembra, se ha descrito una mayor vulnerabilidad a manifestar conductas de tipo-depresivas, lo que podría estar relacionado con diferencias hormonales, metabólicas y neuroinflamatorias asociadas al sexo (Guillot-Sestier et al., 2021; Hodges et al., 2022; Chen et al., 2024). Este patrón se observa especialmente en etapas avanzadas de la vida, cuando la disminución de estrógenos podría incrementar el riesgo de desarrollar alteraciones afectivas (Baek et al., 2024). En este sentido, la presencia de conductas depresivas en la etapa tardía observadas en esta tesis, podría estar vinculada al envejecimiento y a un mayor riesgo de desarrollar un perfil conductual de tipo depresivo.

En estudios clínicos, los hallazgos son consistentes con esta tendencia. El estudio realizado por Crump et al. (2024) muestra que el riesgo de desarrollar depresión es mayor en pacientes con EA, siendo aún más elevado en mujeres que en hombres. (Crump et al., 2024). Asimismo, evidencia que las tasas de depresión fueron más altas durante el primer año luego del diagnóstico de EA, es decir, en etapas tempranas de la enfermedad, aunque el riesgo de desarrollar depresión fue más alto en pacientes de mayor edad (Crump et al., 2024). Esto sugiere que la presencia de conductas de tipo-depresivas observadas en la presente tesis en la etapa tardía, podrían también estar en relación con ratas más envejecidas con mayor riesgo de desarrollar un perfil conductual de tipo-depresivo.

Por otra parte, un estudio realizado en pacientes hombres y mujeres con EA evidencia una evolución hacia el agravamiento de los síntomas neuropsiquiátricos, entre ellos la depresión, a medida que la EA progresa (Steinberg et al., 2008), pudiendo ser esta la causa de haber evidenciado la aparición de conductas de tipo-depresivas en etapas más tardías. Sin embargo, en el estudio realizado por Steinberg et al. (2008), no se evaluó de forma separada la evolución de los síntomas neuropsiquiátricos según el sexo.

7.3. Niveles de citoquinas inflamatorias en plasma, hipocampo y LCR

La cuantificación de mediadores inflamatorios puede realizarse por distintas técnicas, siendo clave su comprensión a la hora de interpretar los resultados. Las variaciones metodológicas utilizadas para la detección de citoquinas, tales como el uso de kits de ELISA, el uso de anticuerpos simples o en paneles multiplex, así como la utilización de distintos reactivos y métodos de detección, pueden terminar por reconocer

distintos antígenos o isoformas proteicas arrojando distintos resultados según la metodología empleada. Este conjunto de variables puede complejizar la interpretación de los resultados (Brosseron et al., 2014). En la EA también influyen otras variables como el estadio de la enfermedad, contribuyendo a la gran heterogeneidad de resultados observados (Brosseron et al., 2014).

El uso de paneles multiplex surge como una herramienta capaz de homogeneizar la medición de varias citoquinas en simultáneo, con el objetivo de permitir la identificación de biomarcadores relacionados con el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades tales como la EA (Brosseron et al., 2014).

En la presente tesis se midieron los niveles de citoquinas inflamatorias en muestras sistémicas (plasma), así como centrales (sobrenadante de hipocampo y LCR) utilizando el kit comercial LEGENDPlex™ Rat Th Cytokine Panel V02 para su posterior medición por citometría de flujo. Dicho kit ha sido validado para la medición de trece citoquinas en muestras de plasma y suero, no así para la medición en sobrenadante de tejido y LCR (BioLegend, 2023), lo cual requirió de ensayos preliminares para evaluar la confiabilidad del kit en la medición de citoquinas en este tipo de muestras. Los resultados muestran la obtención de niveles detectables de citoquinas inflamatorias en las muestras de sobrenadante de tejido y LCR, incluso alcanzando mejores niveles de detección que en muestras de plasma. Se destaca el aporte de los resultados de la tesis en la utilización de este tipo de kit para la medición de citoquinas inflamatorias en muestras no validadas distintas a suero y plasma.

Aunque el kit empleado para la medición de citoquinas está validado para su uso en muestras de plasma, nuestros resultados muestran que los niveles detectables fueron bajos para la mayoría de las citoquinas, con numerosos valores por debajo del límite de detección del citómetro de flujo utilizado, a excepción de MCP-1, cuyos niveles fueron relativamente más elevados. Esta observación podría explicarse por la baja concentración natural de citoquinas en plasma, un hallazgo consistente con lo reportado previamente en la literatura (Morgan et al., 2019).

Los estudios realizados por Morgan et al., (2019) y Campanelli et al., (2025) tuvieron como objetivo identificar biomarcadores plasmáticos en hombres y mujeres con EA, deterioro cognitivo leve y controles sanos mediante ensayos múltiples de ELISA. El estudio de Morgan et al., (2019) evidenció que la eotaxina-1 y MCP-1 presentaban una capacidad predictiva moderada en la progresión de deterioro cognitivo leve a EA, mientras que el trabajo llevado a cabo por Campanelli et al. (2025) evidenció niveles

plasmáticos elevados de IL-7, eotaxina, MCP-1 y MCP-4 como marcadores de deterioro cognitivo temprano, y niveles plasmáticos elevados de IL-16 e IL-8 en pacientes con EA en comparación con aquellos con deterioro cognitivo leve. Esta evidencia sugiere que la medición de biomarcadores plasmáticos podría ser igualmente una herramienta para el diagnóstico preclínico y detección temprana de la progresión a EA, siendo menos invasiva que la obtención de LCR o muestras de tejido.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de ninguna de las citoquinas analizadas en una etapa temprana en las muestras de sobrenadantes del hipocampo. Sin embargo, en la etapa tardía se evidenció una disminución de IL-1 β en los animales tratados respecto a los controles.

Diversos estudios sostienen un rol pro-inflamatorio de IL-1 β en la EA (Caldwell et al., 2021; Abdelhamed et al., 2025). Una expresión elevada de IL-1 β lleva a la hiperfosforilación de tau con la consiguiente pérdida neuronal y exacerba los efectos deletéreos del péptido A β (Wang et al., 2015). En línea con esto, el trabajo realizado por López-Rodríguez et al. (2021) evidenció que, en un modelo de ratones transgénicos APP/PS1 y tejido cerebral de pacientes con EA, la presencia de A β provocó la sobreexpresión de IL-1 β en hipocampo con efectos deletéreos en la progresión de la enfermedad. Sin embargo, más recientemente se ha propuesto un rol dual de IL-1 β en la EA, pudiendo desempeñar un rol tanto pro como antiinflamatorio en diferentes condiciones experimentales y modelos. En este sentido, diversos trabajos han evidenciado, en distintos modelos, un rol antiinflamatorio de IL-1 β en la EA (Shaftel et al., 2007; Tachida et al., 2008). El estudio llevado a cabo por Shaftel et al. (2007) mostró, en un modelo de EA en ratón transgénico (APP^{swe}/PS1^{dE9}), que la sobreexpresión sostenida de IL-1 β en el hipocampo resultó en un estado de neuroinflamación crónico con reducción significativa de las placas de A β (Shaftel et al., 2007). En el estudio llevado a cabo por Tachida et al. (2008) evidenciaron en un modelo en cultivo celular de neuronas corticales humanas, que IL-1 β tiene un rol potenciando el procesamiento de A β por la enzima α -secretasa y disminuyendo su procesamiento por la β -secretasa, resultando en un efecto anti-amiloidogénico (Tachida et al., 2008).

En base a lo anteriormente mencionado, considerando que niveles elevados de IL-1 β pueden ser beneficiosos, podría plantearse que los niveles bajos de IL-1 β observados en hipocampo en la etapa tardía podrían tener un efecto deletéreo sobre los procesos cognitivos y emocionales. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que en esta etapa tardía,

además de los déficits cognitivos detectamos comportamientos tipo-depresivos en las ratas tratadas con STZ.

Destacamos que en las muestras de LCR, se observó un aumento significativo de TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-18, IL-12p70, IL17-A, IL-1 α e IL-10 en las hembras tratadas con STZ al compararlas con sus controles, en la etapa tardía. En la etapa temprana no se observaron diferencias en los niveles de dichas citoquinas entre ambos grupos. Estos resultados sugieren la presencia de una alteración en los procesos inflamatorios a nivel de SNC en etapas tardías de la enfermedad, lo cual podría asociarse con los resultados comportamentales obtenidos.

Debido a que algunas de las citoquinas más estudiadas en relación a la EA tanto en humanos como en modelos experimentales son TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-1 α e IL-10, destacamos la discusión de evidencias relacionadas a estas citoquinas. La evidencia actual indica que la desregulación en los niveles de citoquinas estaría implicada en la patogénesis de la EA (Linnemann y Lang, 2020). Tradicionalmente, las citoquinas han sido agrupadas como pro o antiinflamatorias, dentro de las citoquinas pro-inflamatorias se encuentran TNF- α , IL1- β , IL-6, e IL-1 α y dentro de las antiinflamatorias encontramos a IL-10 (Wautier y Wautier, 2023). Sin embargo, se ha demostrado que esta división no es absoluta y puede variar por muchos factores, entre ellos el tejido, la enfermedad en que se estudie, o la metodología utilizada para el estudio (Shachar y Karin, 2013).

La citoquina TNF- α es una de las citoquinas proinflamatorias que más se ha estudiado en relación a la EA. La misma interviene en la progresión de la enfermedad por múltiples mecanismos, entre ellos: favorece el procesamiento de A β por la γ -secretasa aumentando el depósito de A β y potencia la respuesta inflamatoria cerebral estimulando la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 o IL-6 (Plantone et al., 2023). Un estudio realizado en pacientes con EA evidenció que niveles elevados de TNF- α en suero que se asociaron con un peor rendimiento en tareas cognitivas (Holmes et al., 2009).

Por otro lado, se ha evidenciado que IL-1 β en niveles bajos es un mediador clave en procesos de memoria y aprendizaje en el hipocampo, sin embargo, niveles elevados se asocian a estados pro-inflamatorios provocando déficits cognitivos y contribuyendo al daño neuronal en un contexto de inflamación sistémica o cerebral (Yirmiya y Goshen 2011). La inhibición de TNF- α e IL-1 β mediante la administración de leflunomida en un modelo preclínico de EA en ratas macho evidenció una mejora en las pruebas cognitivas,

lo cual se correlacionó con una disminución en los niveles de TNF- α e IL-1 β en hipocampo, menor activación microglial y reducción de la acumulación de A β (Nafea et al., 2023). Estas evidencias en conjunto indican un rol pro-inflamatorio de TNF- α e IL-1 β a nivel sistémico y central, apoyando nuestro resultado que evidencia la presencia de un déficit cognitivo en la etapa tardía asociado a la presencia de estos marcadores inflamatorios en LCR. De hecho, algunos autores proponen la inhibición de TNF- α como una posible estrategia terapéutica para mejorar la función cognitiva (Plantone et al., 2023).

IL-6 es otra de las citoquinas inflamatorias que aumentó significativamente en las hembras tratadas con STZ en la etapa tardía del modelo, y ha sido ampliamente estudiada en relación con la EA. En condiciones fisiológicas, se ha descrito que IL-6 se expresa en el SNC y participa en funciones de memoria y aprendizaje, cumpliendo un rol principalmente en la potenciación a largo plazo (Balschun et al., 2004). Sin embargo, en un estudio realizado en una mayoría de pacientes hombres con EA, se han reportado niveles elevados de IL-6 en LCR (Blum-Degen et al., 1995). En modelos preclínicos de EA en ratones, se observó que la deficiencia de IL-6 redujo el depósito de A β en el hipocampo, lo cual se asoció con un mejor rendimiento cognitivo (Liu et al., 2024). Resultados similares fueron observados en un estudio realizado en pacientes de ambos sexos con EA donde se evidenció una asociación entre los niveles de IL-6 en LCR, marcadores de daño neuronal y peor rendimiento en pruebas cognitivas (Plantone et al., 2025). Por lo tanto, la elevación de IL-6 observada en las muestras de LCR obtenidas de hembras tratadas con STZ en la etapa tardía, podría estar implicada en el déficit cognitivo y emocional observados en dicha etapa del modelo.

Con respecto a IL-1 α , es una citoquina con un rol pro-inflamatorio que contribuye a la hiperfosforilación de tau favoreciendo la formación de los ovillos neurofibrilares (ShafteI et al., 2007). Se ha propuesto que podría ser potenciadora de una retroalimentación positiva entre procesos neuroinflamatorios y la acumulación de A β (Heneka et al., 2015). Se ha observado su aumento en el LCR de pacientes hombres con deterioro cognitivo leve, postulándose como un evento que ocurre de forma temprana en la patogénesis de la EA y que podría utilizarse como un biomarcador para su detección temprana (Hu et al., 2010). En contraposición a estas evidencias en humanos, nuestros resultados solamente evidencian su aumento de IL-1 α en etapas tardías en las muestras de LCR. Sin embargo, esto resulta de la comparación de resultados entre muestras de LCR de pacientes humanos con nuestro modelo realizado en ratas, no pudiendo ser

completamente extrapolable la evolución de la enfermedad en un modelo animal a humanos.

De forma interesante, esta citoquina fue la única que presentó una variación significativa de sus niveles en plasma, mostrando una disminución en hembras tratadas con STZ comparadas a las controles, en la etapa tardía del modelo. La mayoría de los trabajos que estudiaron la asociación de IL-1 α con la EA han encontrado niveles elevados de la misma en plasma, asociado a un peor rendimiento cognitivo (Mahdavi et al., 2021). Nuestros resultados evidencian por el contrario una disminución en los niveles de IL-1 α en la etapa tardía del modelo. Este hecho podría estar relacionado con la existencia de una disminución de la respuesta inmune periférica, directamente relacionada con el curso progresivo de la enfermedad, aunque este fenómeno no ha sido previamente reportado para IL-1 α .

Los resultados evidenciaron también un aumento de IL-10 en LCR de hembras en la etapa tardía. Dado que IL-10 se encuentra presente en condiciones fisiológicas en el tejido cerebral con un rol tradicionalmente antiinflamatorio, en la EA se ha descrito un rol dual (Kinney et al., 2018). Por un lado, IL-10 puede elevarse de forma compensatoria en respuesta al aumento de citoquinas proinflamatorias tales como IL 1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6 (citoquinas que evidenciamos también elevadas en LCR en nuestro trabajo), siendo capaz de inhibir la función de éstas contrarrestando el estado pro-inflamatorio presente en la EA (Kinney et al., 2018). Por otra parte, niveles elevados de IL-10 podrían exacerbar la función de la microglía, produciendo un efecto pro-inflamatorio. En este sentido, el estudio realizado por Guillot-Sestier et al. (2015) evidenció que en ratones APP/PS1 *knockout* para IL-10 los depósitos de A β se redujeron y mejoró el rendimiento cognitivo (Guillot-Sestier et al., 2015). Por lo tanto, en etapas tardías, los niveles elevados de IL-10 podrían contribuir a la progresión de la EA al producir una respuesta inmune desadaptativa (Guillot-Sestier et al., 2015; Kinney et al., 2018).

Por otra parte, se observó en las muestras de hipocampo y LCR, un aumento estadísticamente significativo en los niveles de las citoquinas inflamatorias entre animales controles de la etapa tardía respecto a la etapa temprana, sugiriendo que algunas citoquinas podrían elevarse con el envejecimiento en hembras. Las citoquinas que aumentaron tanto en hipocampo como LCR fueron IL-12p70, IL-1 β e IL-1 α , mientras que en LCR también aumentaron los niveles de IL-6.

Un estudio realizado en un modelo animal murino, mostró un incremento de citoquinas inflamatorias en hipocampo relacionado con la edad, entre ellas IL-1 β e IL-1 α e IL-12p70. Este aumento fue más pronunciado en hembras, remarcando la existencia de una relación entre procesos inflamatorios y el sexo en condiciones fisiológicas, con una mayor susceptibilidad de las hembras a presentar marcadores inflamatorios más elevados (Porcher et al., 2021). Además, esto no se observó en otras regiones cerebrales estudiadas tales como corteza prefrontal, sugiriendo la estrecha relación entre los procesos neuroinflamatorios y algunas funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria (Porcher et al., 2021).

No se evidenciaron cambios en los niveles de citoquinas plasmáticas en los grupos control en ambas etapas, sugiriendo que los cambios en los niveles de citoquinas inflamatorias asociados a la edad podrían ser un fenómeno observado principalmente a nivel del SNC.

Los resultados en conjunto muestran que la presencia simultánea de déficit cognitivo con un perfil conductual de tipo-depresivo se asocia a la elevación de citoquinas inflamatorias a nivel del SNC, específicamente en las muestras obtenidas de LCR, lo cual revela la importancia de este tipo de muestras, tanto en animales como en humanos y la posibilidad de cuantificar citoquinas como forma de poner en evidencia otras alteraciones relacionadas tanto a la EA como a los estados depresivos.

A diferencia de lo observado en la etapa tardía, el déficit cognitivo observado en la etapa temprana no se acompañó de conductas de tipo-depresivas ni de variaciones significativas en citoquinas inflamatorias. Estas evidencias apoyan el hecho de que los mecanismos neuroinflamatorios están vinculados a la comorbilidad entre ambas patologías y no solamente a la presencia de déficit cognitivo. Un estudio realizado en pacientes con EA que analizó la presencia de depresión asociada a niveles de citoquinas proinflamatorias medidas en suero, evidenció que los niveles séricos de IL-6 y TNF- α están elevados en pacientes hombres y mujeres con EA y depresión en comparación con pacientes hombres y mujeres que solo presentaban EA (Khemka et al., 2014). Sin embargo, nuestro estudio no evidenció variaciones a nivel periférico, lo cual, como se expuso anteriormente, podría deberse a la baja concentración de citoquinas a nivel periférico, por fuera de la capacidad de detección del citómetro de flujo y kit utilizado. Las muestras de LCR demostraron ser las muestras que mejor pusieron en evidencia modificaciones en los niveles de varias de las citoquinas cuantificadas.

Los resultados de la presente tesis ponen de manifiesto que la neuroinflamación podría ser uno de los mecanismos patogénicos que subyacen a la comorbilidad entre la EA y la depresión en hembras en etapas tardías de la enfermedad.

El análisis de los resultados sugiere que no existe una relación entre el desempeño comportamental en el NOR, o en el TNF, y la fase del ciclo estral en que se encontraban las hembras al momento de los ensayos, en ninguna de las etapas del modelo. Estos resultados concuerdan con lo observado en otros estudios, en los que no se evidenció una influencia de la fase del ciclo estral en tareas de memoria en ratas hembra (Sutcliffe et al., 2007; Chari et al., 2020; Jayachandran et al., 2022). Sin embargo, el estudio llevado a cabo por Kokras et al. (2015), que estudió el comportamiento de ratas hembra en el TNF a lo largo de las fases del ciclo estral, mostró que la respuesta al tratamiento anti-depresivo con ISRS fue diferente según la fase del ciclo, mostrando la importancia de incluir esta medición en los estudios con ratas hembras cuando se incluye la medición de conductas pro- o anti-depresivas (Kokras et al., 2015).

8. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis muestran que las alteraciones cognitivas en hembras se manifiestan desde una etapa temprana en este modelo de EA esporádico.

El déficit cognitivo se acompaña de un perfil de tipo-depresivo en la etapa tardía del modelo. La aparición conjunta de alteraciones cognitivas y comportamientos de tipo-depresivo se asoció con un aumento de citoquinas inflamatorias en LCR, sugiriendo que la alta comorbilidad entre la EA y la depresión en hembras podría estar asociada al aumento en los niveles de citoquinas inflamatorias en el SNC.

Ninguno de los cambios observados se asoció con la fase del ciclo estral de las hembras en ninguna de las etapas del modelo, por lo que las alteraciones cognitivas observadas en la EA, así como su comorbilidad con la depresión y la elevación de marcadores inflamatorios a nivel central, no estarían bajo la influencia de factores hormonales relacionados a la etapa del ciclo estral.

9. PERSPECTIVAS

- Avanzar en la caracterización del curso temporal del modelo de EA esporádico inducido por STZ en hembras: incorporar una etapa intermedia (T60). Estudiar en qué momento comienzan a aparecer las conductas tipo-depresivas.
- Evaluar los niveles de citoquinas inflamatorias a un estadio intermedio (T60) y su relación con la evolución temporal del déficit cognitivo y las conductas de tipo-depresivas.
- Analizar la presencia de marcadores inflamatorios en otras regiones vinculadas a procesos cognitivos y de memoria tales como corteza prefrontal e hipotálamo.
- Analizar la presencia de cambios inflamatorios a nivel histológico en muestras de tejido cerebral.
- Analizar las modificaciones en los niveles de BDNF en muestras de LCR, hipocampo y plasma obtenidas en las tres etapas (T30, T60 y T120), con el objetivo de poner en evidencia la presencia de alteraciones en procesos de plasticidad relacionada a los resultados obtenidos en la presente tesis.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Aalten, P., Verhey, F. R., Boziki, M., Bullock, R., Byrne, E. J., Camus, V., Caputo, M., Collins, D., De Deyn, P. P., Elina, K., Frisoni, G., Girtler, N., Holmes, C., Hurt, C., Marriott, A., Mecocci, P., Nobili, F., Ousset, P. J., Reynish, E., Salmon, E., Tsolaki, M., Vellas, B. & Robert, P. H. (2007). Neuropsychiatric syndromes in dementia. Results from the European Alzheimer Disease Consortium: part I. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 24(6):457-63. doi:10.1159/000110738.
- 2) Abdelhamed, H. G. (2025). Brain interleukins and Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 50(5), 1234–1245. <https://doi.org/10.1007/s11011-025-01538-5>.
- 3) Aksman, L. M., Oxtoby, N. P., Scelsi, M. A., Wijeratne, P. A., Young, A. L., Alves, I. L., Collij, L. E., Vogel, J. W., Barkhof, F., Alexander, D. C. & Altmann, A. (2023). A data-driven study of Alzheimer's disease related amyloid and tau pathology progression. *Brain*. 146(12):4935-4948. doi: 10.1093/brain/awad232.
- 4) Alexopoulos, G. S. (2019). Mechanisms and treatment of late-life depression. *Transl Psychiatry*. 9(1):188. doi: 10.1038/s41398-019-0514-6.
- 5) Alkhalifa, A. E., Al Mokhlif, A., Ali, H., Al-Ghraiyyah, N. F., & Syropoulou, V. (2025). Anti-Amyloid Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Evidence, ARIA Risk, and Precision Patient Selection. *J. Pers Med*. (15):437. doi: 10.3390/jpm15090437.
- 6) Alzheimer's Association. (2022). 2022 *Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimer's & Dementia*, 18(4), 700–789. <https://doi.org/10.1002/alz.12638>.
- 7) Alzheimer's Association. (2023). 2023 *Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimer's & Dementia*, 19(4), 1598-1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>.
- 8) Alzheimer's Disease International. (2025). *ADI leads new research forecasting dementia to become the 3rd leading cause of death by 2040*. <https://www.alzint.org/news-events/news/adi-leads-new-research-forecasting-dementia-to-become-the-3rd-leading-cause-of-death-by-2040/>.
- 9) Andrade-Guerrero, J., Santiago-Balmaseda, A., Jeronimo-Aguilar, P., Vargas-Rodriguez, I., Cadena-Suárez, A. R., Sánchez-Garibay, C., Pozo-Molina, G., Méndez-Catalá, C. F., Cardenas-Aguayo, M. D., Diaz-Cintra, S., Pacheco-Herrero, M., Luna-Muñoz, J. & Soto-Rojas, L. O. (2023). Alzheimer's disease: an updated overview of its genetics. *Int J Mol Sci*. doi:10.3390/ijms24043754.

- 10) Baek, D. C., Kang, J. Y., Lee, J. S., Lee, E. J., & Son, C. G. (2024). Linking alterations in estrogen receptor expression to memory deficits and depressive behavior in an ovariectomy mouse model. *14*(1):6854. doi: 10.1038/s41598-024-57611-z.
- 11) Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet*. 377(9770):1019-31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
- 12) Balschun, D., Wetzel, W., & Wagner, S. (2004). Interleukin-6: A cytokine to forget. *The FASEB Journal*, 18(14), 1788–1790. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1625fje>.
- 13) Bao, J., Mahaman, Y., Liu, R., Wang J. Z., Zhang, Z., Zhang, B. & Wang, X., (2017). Sex differences in the cognitive and hippocampal effects of streptozotocin in an animal model of sporadic AD. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 9:347. doi: 10.3389/fnagi.2017.00347.
- 14) Barker, G. R., Banks, P. J., Scott, H., Ralph, G. S., Mitrophanous, K. A., Wong, L. F., Bashir, Z. I., Uney, J. B. & Warburton, E. C. (2017). Separate elements of episodic memory subserved by distinct hippocampal-prefrontal connections. *Nat Neurosci*. 20(2):242-250. doi: 10.1038/nn.4472.
- 15) Baufeld, C., Pagenkopf, L., & Butovsky, O. (2023). Sex differences in the inflammatory profile in the brain of young and aged mice. *Cells*, 12(10), 1372. <https://doi.org/10.3390/cells12101372>.
- 16) Berridge, C. W., Martin, A. J., Haupalo, S. & Nicol, S. E. (2022). Estrus cycle-dependent working memory effects of prefrontal cortex corticotropin-releasing factor neurotransmission. *Neuropsychopharmacology*. 47(12):2016-2023. doi: 10.1038/s41386-022-01349-7.
- 17) Bigelow, L. J., Pope, E. K., MacDonald, D. S., Rock, J. E. & Bernard, P. B. (2023). Getting a handle on rat familiarization: The impact of handling protocols on classic tests of stress in *Rattus norvegicus*. *Laboratory Animals*. 57(3):259-269. doi:10.1177/00236772221142687.
- 18) BioLegend. (2023). *LEGENDplex™ Rat Th Cytokine Panel V02 (13-plex) con VbP: Manual del producto*. https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/Rat_Th_Cytokine_Panel_Full_Kit.pdf
- 19) Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., & Riederer, P. (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of

- Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 202(1–2), 17–20. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12192-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12192-7)
- 20) Briggs, R., Kennelly, S. P. & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond)*. 16(3):247-53. doi: 10.7861/clinmedicine.16-3-247.
 - 21) Brosseron, F., Krauthausen, M., Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2014). Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A comparative overview. *Molecular Neurobiology*, 50(3), 534–544. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8657-1>.
 - 22) Browne, T. C., McQuillan, K., McManus, R. M., O'Reilly, J. A., Mills, K. H. & Lynch, M. A. (2013). IFN- γ Production by amyloid β -specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol*. 190(5):2241-51. doi: 10.4049/jimmunol.1200947.
 - 23) Budd Haeberlein, S., Aisen, P. S., Barkhof, F., Chalkias, S., Chen, T., Cohen, S., et al. (2022). Two randomized phase 3 studies of aducanumab in early Alzheimer's disease. *J Prev Alzheimers Dis*. (9)197-210. doi:10.14283/jpad.2022.30
 - 24) Cai, W., Wu, T., & Chen, N. (2023). The amyloid-beta clearance: from molecular targets to glial and neural cells. *Biomolecules*. (13):313. doi:10.3390/biom13020313.
 - 25) Caldwell, J. Z. K., Kinney, J. W., Ritter, A., Salazar, A., Wong, C. G., Cordes, D. & Slavich, G. M. (2021). Inflammatory cytokine levels implicated in Alzheimer's disease moderate the effects of sex on verbal memory performance. *Brain Behav Immun*. 95:27-35. doi: 10.1016/j.bbi.2020.12.001.
 - 26) Campanelli, L., Galeano, P., Prestia, F.A., Cuesta, C., Dalmaso, M. C., Flores-López, M., Gona, C., Irureta, N., Kairiyama, C., Lisso, J., López-Gamero, A. J., Mintz, I., Medel, N., Campuzano, K. S., Muchnik, C., Novack, G. V., Olivar, N., Quiroga, I., Requena-Ocaña, N., Reyes-Bueno, J. A., Serrano-Castro, P., Sevillano, Z., Solis, P., Suárez, J., Villella, I., Wukitsevit, N., Castaño, E. M., Taragano, F., Kochen, S., Politis, D. G., Brusco, L. I., Rodríguez de Fonseca, F., & Morelli L. (2025). Blood levels of cytokines highlight the role of inflammation in Alzheimer's disease. *Heliyon*. 11(2):e41725. doi: 10.1016/j.heliyon.2025.e41725.
 - 27) Canevelli, M., Quarata, F., Remiddi, F., Lucchini, F., Lacorte, E., Vanacore, N., Bruno, G. & Cesari, M. (2017). Sex and gender differences in the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review of randomized controlled trials. *Pharmacol Res*. 115:218-223. doi:10.1016/j.phrs.2016.11.035.

- 28) Caraci, F., Spampinato, S. F., Morgese, M. G., Tascetta, F., Salluzzo, M. G., Giambirtone, M. C., Caruso, G., Munafò, A., Torrisi, S. A., Leggio, G. M., Trabace, L., Nicoletti, F., Drago, F., Sortino, M. A. & Copani, A. (2018). Neurobiological links between depression and AD: The role of TGF- β 1 signaling as a new pharmacological target. *Pharmacol Res.* 130:374-384. doi: 10.1016/j.phrs.2018.02.007.
- 29) Carbonell, F., McNicoll, C., Zijdenbos, A. P. & Bedell B. J. (2025). Tau-related reduction of glucose metabolism in mild cognitive impairment occurs independently of APOE ϵ 4 genotype and is influenced by A β . *Alzheimer's Dement.* 21:e14625. <https://doi.org/10.1002/alz.14625>
- 30) Chari, T., et al. (2020). Minimal influence of estrous cycle on studies of female mouse behaviors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 114. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00113>
- 31) Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* 14:450-464. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.014.
- 32) Chen, Y. H., Wang, Z. B., Liu, X. P., Xu, J. P. & Mao, Z. Q. (2024). Sex differences in the relationship between depression and Alzheimer's disease-mechanisms, genetics, and therapeutic opportunities. *Front Aging Neurosci.* 16:1301854. doi: 10.3389/fnagi.2024.1301854.
- 33) Chi, S., Yu, J. T., Tan, M. S. & Tan, L. (2014). Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanisms, and management. *J Alzheimers Dis.* 42(3):739-55. doi: 10.3233/JAD-140324.
- 34) Chow, V. W., Mattson, M. p., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.* (12):1-12. doi:10.1007/s12017-009-8104-z.
- 35) Chundu, U. C., Thiriveedhi, S. R., Bhatti, C., Mupparaju, J. S., Otinashivili, N., & Gelishivili, E. (2025). A systematic review of the efficacy and safety of anti-amyloid monoclonal antibodies in alzheimer's disease. *Cureus.* 17e85377. doi: 10.7759/cureus.85377
- 36) Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., Chaimani, A., Atkinson, L. Z., Ogawa, Y., Leucht, S., Ruhe, H. G., Turner, E. H., Higgins, J. P. T., Egger, M., Takeshima, N., Hayasaka, Y., Imai, H., Shinohara, K., Tajika, A., Ioannidis, J. P. A. & Geddes, J. R. (2018). Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the

- acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet*. 391(10128):1357-1366. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32802-7.
- 37) Coppen, A. (1967). The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*. 113(504):1237-64. doi: 10.1192/bjp.113.504.1237.
 - 38) Croce, N., Ciotti, M. T., Gelfo, F., Cortelli, S., Federici, G., Caltagirone, C., Bernardini, S. & Angelucci, F. (2012). Neuropeptide Y protects rat cortical neurons against β -amyloid toxicity and re-establishes synthesis and release of nerve growth factor. *ACS Chem Neurosci*. 3(4):312-8. doi: 10.1021/cn200127e.
 - 39) Crump, C., Sundquist, K., Sundquist, J., & Winkleby, M. A. (2024). Risk of depression in persons with Alzheimer's disease: A national cohort study. *Alzheimer's & Dementia*, 20(5), 1234–1242. <https://doi.org/10.1002/dad2.12584>.
 - 40) Cryan, J. F., Valentino, R. J. & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience Biobehav Rev*. 29(4-5):547-69. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.008.
 - 41) Davies, P. & Maloney, A. J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2(8000):1403. doi: 10.1016/s0140-6736(76)91936-x.
 - 42) Davis, M. L. & Barrett, A. M. (2009). Selective benefit of donepezil on oral naming in Alzheimer's disease in men compared to women. *CNS Spectr*. 14(4):175-6. doi: 10.1017/s1092852900020174.
 - 43) De Strooper B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev*. 90(2):465-94. doi:10.1152/physrev.00023.2009.
 - 44) Detke, M. J., Rickels, M. & Lucki I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*. 121(1):66-72. doi: 10.1007/BF02245592.
 - 45) Dewanjee, S., Chakraborty, P., Bhattacharya, H., Chacko, L., Singh, B., Chaudhary, A., Javvaji, K., Pradhan, S. R., Vallamkondu, J., Dey, A., Kalra, R. S., Jha, N. K., Jha, S. K., Reddy, P. H. & Kandimalla, R. (2022). Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 193(Pt 1):134-157. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.032.
 - 46) Duyckaerts, C., Delatour, B. & Potier, M. C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathology*. 118(1):5-36. doi: 10.1007/s00401-009-0532-1.

- 47) Eikelboom, W.S., Van den Berg, E., Singleton, E. H., Baart, S. J., Coesmans, M., Leeuwis, A. E., Teunissen, C. E., Van Berckel, B. N. M., Pijnenburg, Y. A. L., Scheltens, P., Van der Flier, W. M., Ossenkoppele, R. & Papma, J. M. (2021). Neuropsychiatric and Cognitive Symptoms Across the Alzheimer Disease Clinical Spectrum: Cross-sectional and Longitudinal Associations. *Neurology*. 97(13): e1276-e1287. doi:10.1212/WNL.00000000000012598
- 48) Elgellaie, A., Thomas, S. J., Kaelle, J., Bartschi, J. & Larkin, T. (2023). Pro-inflammatory cytokines IL1- α , IL-6 and TNF- α in major depressive disorder: sex-specific associations with psychological symptoms. *Eur J Neurosci*. 57(11):1913-1928. doi: 10.1111/ejn.15992.
- 49) Elser, H., Sørensen, H. T., & Gasse, C. (2023). Association of early-, middle-, and late-life depression with incident dementia in a Danish cohort. *JAMA Neurology*, 80(9), 950–957. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.2262>
- 50) Enache, D., Pariante, C. M. & Mondelli, V. (2019). Markers of central inflammation in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of studies examining cerebrospinal fluid, positron emission tomography and post-mortem brain tissue. *Brain Behav Immun*. 81:24-40. doi: 10.1016/j.bbi.2019.06.015.
- 51) Ennaceur, A. & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31(1):47-59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x.
- 52) Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*. 215(2):244-54. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.036.
- 53) Filon, J. R., Intorcchia, A. J., Sue, L. I., Vazquez Arreola, E., Wilson, J., Davis, K. J., Sabbagh, M. N., Belden, C. M., Caselli, R. J., Adler, C. H., Woodruff, B. K., Rapsack, S. Z., Ahern, G. L., Burke, A. D., Jacobson, S., Shill, H. A., Driver-Dunckley, E., Chen, K., Reiman, E. M., Beach, T. G., & Serrano, G. E. (2016). Gender differences in Alzheimer disease: Brain atrophy, histopathology burden, and cognition. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 75(8), 748–754. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw047>.
- 54) Galeano, P., Martino Adami, P. V., Do Carmo, S., Blanco, E., Rotondaro, C., Capani, F., Castaño, E. M., Cuello, A. C. & Morelli, L. (2014). Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Front Behav Neurosci*. 8:321. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00321.

- 55) Guillot-Sestier, M.V., Doty, K.R., Gate, D., Rodriguez, J., Leung, B.P., Rezai-Zadeh, K. & Town, T. (2015). IL10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron*. 85(3):534-48. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.068.
- 56) Guillot-Sestier, M.V., Araiz, A. R., Mela, V., Gaban, A. S., O'Neill, E., Joshi, L., et al. (2021). Microglial metabolism is a pivotal factor in sexual dimorphism in Alzheimer's disease. *Commun Biol*. 4(1):711. doi: 10.1038/s42003-021-02259-y.
- 57) Goshi, N., Lam, D., Bogguri, C., George, V. K., Sebastian, A., Cadena, J., Leon, N. F., Hum, N. R., Weilhammer, D. R., Fischer, N. O. & Enright, H. A. (2025). Direct effects of prolonged TNF- α and IL-6 exposure on neural activity in human iPSC-derived neuron-astrocyte co-cultures. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 19, 1512591. <https://doi.org/10.3389/fncel.2025.1512591>
- 58) Hao, Y., Ge, H., Sun, M., & Gao, Y. Selecting an appropriate animal model of depression. (2019). *Int J Mol*. 20(19):4827. doi:10.3390/ijms20194827.
- 59) Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>.
- 60) Hayley, S., Hakim, A. M. & Albert, P. R. (2021). Depression, dementia and immune dysregulation. *Brain*. 144(3):746-760. doi: 10.1093/brain/awaa405.
- 61) Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Stutz, A. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5).
- 62) Hernández, M. E., González-Celis, A. L., & Juárez-Cedillo, T. (2022). La depresión y su relación con el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer: Un estudio de revisión sistemática. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 57(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2021.10.002>.
- 63) Hirata-Fukae, C., Li, H. F., Hoe, H. S., Gray, A. J., Minami, S. S., Hamada, K., et al. (2008). Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain research*. 12116:92-103. doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.079.
- 64) Hodges, T. E., Lieblich, S. E., Rechlin, R. K., & Galea, L. A.M. (2022). Sex differences in inflammation in the hippocampus and amygdala across the lifespan in rats: associations with cognitive bias. *Immun Ageing* 19(1):43. doi: 10.1186/s12979-022-00299-4

- 65) Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C., Kerr, S., Culliford, D. & Perry, V. H. (2009). Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 73(10):768-74. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bb95.
- 66) Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., Suzuki, M., Nishihara, M., Takahashi, M. & Iwakura, Y. (1998). Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*. 187(9):1463-75. doi: 10.1084/jem.187.9.1463.
- 67) Hu, W. T., Chen-Plotkin, A., Arnold, S. E., Grossman, M., Clark, C. M., Shaw, L.M., Pickering, E., Kuhn, M., Chen, Y., McCluskey, L., Elman, L., Karlawish, J., Hurtig, H.I., Siderowf, A., Lee, V. M., Soares, H. & Trojanowski, J. Q. (2010). Novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol*. 119(6):669-78. doi: 10.1007/s00401-010-0667-0.
- 68) Huang, Y., Henry, C. J., Dantzer, R., Johnson, R. W. & Godbout, J. P. (2008). Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiol Aging*. 29(11):1744-53. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.012.
- 69) Jang, Y. J., Kim, M. J., Lee, S. J., Lim, S. W., & Kim, D. K. (2025). Oxidative stress and risk of dementia in older patients with depression: A longitudinal cohort study using plasma biomarkers. *Medicina*, 61(1), 108. <https://doi.org/10.3390/medicina61010108>.
- 70) Jaqua, E. E., Tran, M. N. & Hanna, M. (2024). Alzheimer disease: treatment of cognitive and functional symptoms. *Am Fam Physician*. 110(3):281-293. PMID: 39283851.
- 71) Jayaraman, A., Htike, T. T., James, R., Picon, C. & Reynolds, R. (2021). TNF-mediated neuroinflammation is linked to neuronal necroptosis in Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol Commun*. 9(1):159. doi: 10.1186/s40478-021-01264-w.
- 72) Johansson, P., Almqvist, E. G., Wallin, A., Johansson, J. O., Andreasson, U., Blennow, K., Zetterberg, H. & Svensson, J. (2015). Cerebrospinal fluid substance P concentrations are elevated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 609:58-62. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.006.

- 73) Karagas, N., Young, J. E., Blue, E. E. & Jayadev, S. (2025). The Spectrum of Genetic Risk in Alzheimer Disease. *Neurol Genet.* 11:e200224. doi:10.1212/NXG.0000000000200224
- 74) Karki, R., Sharma, B. R., Tuladhar, S., Williams, E. P., Zalduondo, L., Samir, P., & Kanneganti, T. D. (2021). Synergism of TNF- α and IFN- γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. *Cell*, 184(1), 149–168.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025>
- 75) Karran, E., Mercken, M. & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 10(9):698-712. doi: 10.1038/nrd3505.
- 76) Khemka, V. K., Ganguly, A., Bagchi, D., Ghosh, A., Bir, A., Biswas, A., Chattopadhyay, S. & Chakrabarti, S. (2014). Raised serum proinflammatory cytokines in Alzheimer's disease with depression. *Aging Dis.* 5(3):170-6. doi: 10.14336/AD.2014.0500170.
- 77) Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., & Salazar, A. M. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 17(3), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.lancet.2018.06.014>
- 78) Kolahchi, Z., Henkel, N., Eladawi, M. A., Villarreal, E. C., Kandimalla, P., Lundh, A., et al. (2024). Sex and gender differences in alzheimer's disease: genetic, hormonal, and inflammation impacts. *Int J Mol Sci.* 25(15)>8485. doi: 10.3390/ijms25158485.
- 79) Kommaddi, R. P., Verma, A., Muniz-Terrera, G., Tiwari, V., Chithanathan, K., Diwakar, L., et al. (2023). Sex difference in evolution of cognitive decline: studies on mouse model and the dominantly inherited Alzheimer network cohort. 13(1):123. doi:10.1038/s41398-023-02411-8.
- 80) Knezovic, A., Osmanovic-Barilar, J., Curlin, M., Hof, P. R., Simic, G., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2015). Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* (122):577-592. <https://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>.
- 81) Kolisnyk, B., Al-Onaizi, M., Soreq, L., Barbash, S., Bekenstein, U., Haberman, N., Hanin, G., Kish, M. T., Souza da Silva, J., Fahnestock, M., Ule, J., Soreq, H., Prado, V. F. & Prado, M. A. M. (2017). Cholinergic Surveillance over Hippocampal RNA

- Metabolism and Alzheimer's-Like Pathology. *Cereb Cortex*. 27(7):3553-3567. doi: 10.1093/cercor/bhw177.
- 82) Kravitz, E., Gaisler-Salomon I. & Biegon, A. (2013). Hippocampal glutamate NMDA receptor loss tracks progression in Alzheimer's disease: quantitative autoradiography in postmortem human brain. *PLoS One*. 8(11): e81244. doi: 10.1371/journal.pone.0081244.
 - 83) Kokras, N., Antoniou, K., Mikail, H. G., Kafetzopoulos, V., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Dalla, C. (2015). Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*, 99, 408–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.016>
 - 84) Kommaddi, R.P., Verma, A., Muniz-Terrera, G., Tiwari, V., Chithanathan, K., Diwakar, L., Gowaikar, R., Karunakaran, S., Malo, P. K., Graff-Radford, N. R., Day, G. S., Laske, C., Vöglein, J., Nübling, G., Ikeuchi, T. & Kasuga, K. (2023). Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN); Ravindranath V. Sex difference in evolution of cognitive decline: studies on mouse model and the Dominantly Inherited Alzheimer Network cohort. *Transl Psychiatry*. 13(1):123. doi: 10.1038/s41398-023-02411-8.
 - 85) Labaka, A., Goñi-Balentziaga, O., Lebeña, A. & Pérez-Tejada, J. (2018). Biological Sex Differences in Depression: A Systematic Review. *Biol Res Nurs*. 20(4):383-392. doi: 10.1177/1099800418776082.
 - 86) LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(11):a006320. doi:10.1101/cshperspect.a006320.
 - 87) Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2):216-26. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7.
 - 88) León-Arcia, K., Andrade-Guerrero, J., Martínez-Orozco, H., Villegas-Rojas, M. M., Pérez-Segura, I., López-Ramírez, I., et al. (2025). First unified time-course of Alzheimer's-like pathology in the intracerebroventricular streptozotocin-rat model: a systematic review. *Aging Research Reviews*. 113: 102918. doi:10.1016/j.arr.2025.102918.
 - 89) Leszek, J., Trypka, E., Tarasov, V. V., Ashraf, G. M. & Aliev, G. (2017). Type 3 Diabetes Mellitus: a novel implication of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*. 17(12):1331-1335. doi: 10.2174/1568026617666170103163403.
 - 90) Liu, M., Zhang, L., Wang, Y., & Li, X. (2024). Interleukin-6 deficiency reduces neuroinflammation by inhibiting the STAT3-cGAS-STING pathway in Alzheimer's

- disease mice. *Journal of Neuroinflammation*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-024-02750-3>.
- 91) Linnemann, C. & Lang, U. E. (2020). Pathways Connecting Late-Life Depression and Dementia. *Front Pharmacol*.11:279. doi: 10.3389/fphar.2020.00279.
 - 92) Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., Orgeta, V., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., Samus, Q., Schneider, L. S., Selbæk, G., Teri, L., & Mukadam, N. (2020). *Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. The Lancet*, 396(10248), 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6).
 - 93) López Hanotte, J., Peralta, F., Reggiani, P. C. & Zappa Villar M. F. (2024). Investigating the Impact of Intracerebroventricular Streptozotocin on Female Rats with and without Ovaries: Implications for Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*. 49(10):2785-2802. doi: 10.1007/s11064-024-04204-x.
 - 94) Malhi, G. S. & Mann, J. J. (2018). Depression. *Lancet*. 392(10161):2299-2312. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31948-2.
 - 95) Mahdavi, M., et al. (2021). *Plasma cytokines profile in subjects with Alzheimer's disease: Interleukin 1 alpha as a candidate for target therapy. Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02106-3>
 - 96) Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. & Tanno AP. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.
 - 97) Martinkova, J., Quevenco, F., Karcher, H., Ferrari, A., Sandset, E. C., Szoëke, C., Hort, J., Schmidt, R., Chadha, A. S. & Ferretti, M. T. (2021). Proportion of women and reporting of outcomes by sex in clinical trials for Alzheimer disease: a systematic review and metanalysis. *JAMA Netw Open*. 4(9):e2124124. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.24124.
 - 98) Matousek, S. B., Ghosh, S., Shaftel S. S., Kyrkanides, S., Olschowka, J. A. & O'Banion, M. K. (2012). Chronic IL-1 β -mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol*. 7:156–164.
 - 99) Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.

- 100) Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Levey, A. I. & Wainer, B. H., (1983a). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 214:170–197.
- 101) Mesulam, M. M., Mufson, E. J. & Wainer, B. H. (1986). Three-dimensional representation and cortical projection topography of the nucleus basalis (Ch4) in the macaque: concurrent demonstration of choline acetyltransferase and retrograde transport with a stabilized tetramethylbenzidine method for horseradish peroxidase. *Brain Res*. 367:301– 308.
- 102) Miller, A. H., Maletic, V. & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 65(9):732-41. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.029.
- 103) Millington, C., Sonogo, S., Karunaweera, N., Rangel, A., Aldrich-Wright, J. R., Campbell, I. L., Gyengesi, E. & Münch, G. (2014). Chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease: new perspectives on animal models and promising candidate drugs. *Biomed Res Int*. 2014:309129. doi: 10.1155/2014/309129.
- 104) Ministerio de Salud Pública. (2021). *Plan Nacional de Salud Mental 2020-2027*. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/plan-nacional-salud-mental-2020-2027>.
- 105) Mintun, M. A., Lo, A. C., Duggan-Evans, C., Wessels, A. M., Ardayfio, P. A., Andersen, S. W., et al. (2021). Donanemab in Early Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. (384):1691-1704. doi: 10.1056/NEJMoa2100708
- 106) Morgan, A.R ., Touchard, S., Leckey, C., O'Hagan, C., Nevado-Holgado, A. J., NIMA Consortium., et al. (2019). Inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease plasma. *Alzheimers Dement*. 15(6):776-787. doi: 10.1016/j.jalz.2019.03.007.
- 107) Morito, T., Hashimoto, S., Takamura, R., Watamura, N., Kakiya, N., Fujioka, R., et al. (2025). The role of neprilysin and insulin-degrading enzyme in the etiology of sporadic alzheimer's disease. *J Neurosci*. (45):e2152242025. doi:10.1523/jneurosci.2152-24.2025.
- 108) Myint, A. M. & Kim, Y. K. (2014). Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 48:304-13. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.08.008.
- 109) Nafea, M., Elharoun, M., Abd-Alhaseeb, M. M., & Helmy, M. W. (2023). Leflunomide abrogates neuroinflammatory changes in a rat model of Alzheimer's

disease: The role of TNF- α /NF- κ B/IL-1 β axis inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(3), 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02322-3>

- 110) Naghibi, S., Shariatzadeh, J. M., Barzegari, A., Davoodabadi, A., Ebrahimi, A., Eghdami, E., Fahimpour, N., Ghorbani, M., Mohammadikia, E., Rostami, M. & Salari, A. A. (2021). Treadmill exercise sex-dependently alters susceptibility to depression-like behaviour, cytokines and BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiol Behav.* 241:113595. doi: 10.1016/j.physbeh.2021.113595.
- 111) Niño-Rivero, S., Cabral, R., Fleitas, J., Alcalde-Ahlig, L., Castaño, E. M., Morelli, L., McGregor, R., Galeano, P., & Lagos, P. (2025). Temporal Progression of Recognition Memory Impairment, Astrogliosis, and Cholinergic Dysfunction in the Streptozotocin Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 26:10944. <https://doi.org/10.3390/ijms262210944>
- 112) Nitsch, R. & Hoyer, S. (1991). Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett.* 128(2):199-202. doi: 10.1016/0304-3940(91)90260-z.
- 113) Ogunmokun, G., Dewanjee, S., Chakraborty, P., Valupadas, C., Chaudhary, A., Kolli, V., Anand, U., Vallamkondu, J., Goel, P., Paluru, H. P. R., Gill, K. D., Reddy, P. H., De Feo, V. & Kandimalla, R. (2021). The Potential Role of Cytokines and Growth Factors in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Cells.* 10(10):2790. doi: 10.3390/cells10102790.
- 114) Olajide, O. J., Suvanto, M. E. & Chapman, C. A. (2021). Molecular mechanisms of neurodegeneration in the entorhinal cortex that underlie its selective vulnerability during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol Open.* 10(1): bio056796. doi: 10.1242/bio.056796.
- 115) Onos, K. D., Sukoff Rizzo, S. J., Howell, G. R., & Sasner, M. (2015). Toward more predictive genetic mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 122:1-11. doi:10.1016/j.brainresbull.2015.12.003
- 116) Organización Mundial de la Salud. (2023). *Dementia*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- 117) Organización Mundial de la Salud. (2023). *Duración del tratamiento antidepressivo para el trastorno depresivo en adultos* (Recurso de evidencia mhGAP). Organización Mundial de la Salud.

<https://cdn.who.int/media/docs/default-source/mental-health/mhgap/depression/duration-of-antidepressant-treatment-2023.pdf>

- 118) Organización Panamericana de la Salud. (2018). *Trastornos mentales en la Región de las Américas*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49578>.
- 119) Ossendorff, R., Kurth, S., Wang, S., Jaenisch, M., Assaf, E., Scheidt, S., Welle, K., Burger, C., Wirtz, D. C., Strauss, A. C. & Schildberg, F. A. (2024). Comparison of Concentration- and Homology-Dependent Effects of the Proinflammatory Cytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) in a Bovine Chondrocyte Inflammation Model. *Cells*. 14(1):30. doi: 10.3390/cells14010030.
- 120) Palop, J. J. & Mucke, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*. 13(7):812-8. doi: 10.1038/nn.2583.
- 121) Pérez-Figueroa, E., Zamudio-Cuevas, Y., Rosas-Ballina, M. & Martínez-Gómez, M. (2019). Interleukin-1 α amplifies NOD2-induced inflammatory responses by potentiating MAPK signaling in human peripheral blood mononuclear cells and mouse macrophages. *Laboratory Investigation*. 99(9), 1304–1315.
- 122) Perry, E. K., Perry, R. H., Blessed, G. & Tomlinson, B. E. (1977). Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet*. 1(8004):189. doi: 10.1016/s0140-6736(77)91780-9.
- 123) Pestana, J. E. & Graham, B. M. (2024). The impact of estrous cycle on anxiety-like behaviour during unlearned fear tests in female rats and mice: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 164:105789. doi: 10.1016/j.neubiorev.2024.105789.
- 124) Peters, A. T., Ren, X., Bessette, K. L., George, N., Kling, L. R., Thies, B., West, A. E., Langenecker, S. A. & Pandey, G. N. (2021). Inflammation, depressive symptoms, and emotion perception in adolescence. *J Affect Disord*. 295:717-723. doi: 10.1016/j.jad.2021.08.126.
- 125) Petkus, A. J., Williams, S. M., & Thompson, W. K. (2024). 20-year depressive symptoms, dementia, and structural brain changes in older women. *Alzheimer's & Dementia*, 20(1), 123–134. <https://doi.org/10.1002/alz.13781>
- 126) Pigott, H. E., Kim, T., Xu, C., Kirsch, I. & Amsterdam, J. (2023). What are the treatment remission, response and extent of improvement rates after up to four trials of antidepressant therapies in real-world depressed patients? A reanalysis of the

- STAR*D study's patient-level data with fidelity to the original research protocol. *BMJ Open*. 13(7):e063095. doi: 10.1136/bmjopen-2022-063095.
- 127) Plantone, D. (2023). *The role of TNF- α in Alzheimer's disease: A narrative review. Cells*, 13(1), 54. <https://doi.org/10.3390/cells13010054>.
 - 128) Plantone, D., et al. (2025). CSF IL-6, GDF-15, GFAP and NfL levels in early Alzheimer disease: A pilot study. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 10(2), 123–134. <https://doi.org/10.1177/17562864251314773>.
 - 129) Porcher, L., et al. (2021). Aging triggers an upregulation of a multitude of cytokines in the male and especially the female rodent hippocampus, but more discreet changes in other brain regions. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02252-6>
 - 130) Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 47(4):379-91. doi: 10.1016/0014-2999(78)90118-8.
 - 131) Porsolt, R. D., Brossard, G., Hautbois, C. & Roux, S. (2001). Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current protocols in neuroscience*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0810as14>.
 - 132) Qian, L., Wei, S. J., Zhang, D., Hu, X., Xu, Z., Wilson, B., El-Benna, J., Hong, J. S. & Flood, P. M. (2008). Potent anti-inflammatory and neuroprotective effects of TGF- β 1 are mediated through the inhibition of ERK and p47phox-Ser345 phosphorylation and translocation in microglia. *J Immunol*. 181(1):660-8. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.660.
 - 133) Ransohoff, R. M. & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 122(4):1164-71. doi: 10.1172/JCI58644.
 - 134) Reichenberg, A., Yirmiya, R., Schuld, A., Kraus, T., Haack, M., Morag, A. & Pollmächer, T. (2001). Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry*. 58(5):445-52. doi: 10.1001/archpsyc.58.5.445.
 - 135) Ricciarelli, R. & Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuroparmacol*. 15(6):926-935. doi: 10.2174/1570159X15666170116143743.
 - 136) Rosende-Roca, M., García-Gutiérrez, F., Cantero-Fortiz, Y., Alegret, M., Pytel, V., Cañabate, P., González-Pérez, A., de Rojas, I., Vargas, L., Tartari, J. P., Espinosa, A., Ortega, G., Pérez-Cordón, A., Moreno, M., Preckler, S., Seguer, S., Gurruchaga,

- M. J., Tárraga, L., Ruiz, A., Valero, S., Boada, M. & Marquié, M. (2025). Exploring sex differences in Alzheimer's disease: a comprehensive analysis of a large patient cohort from a memory unit. *Alzheimers Res Ther.* 17(1):27. doi: 10.1186/s13195-024-01656-9.
- 137) Ruiz Viroga, V., de Ceglia, M., Morelli, L., Castaño, E. M., Blanco Calvo, E., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca, F., Galeano, P. & Lagos, P. (2023). Acute intrahippocampal administration of melanin-concentrating hormone impairs memory consolidation and decreases the expression of MCHR-1 and TrkB receptors. *Progress of Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 123;110703; 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110703>.
 - 138) Santiago, J. A. & Potashkin, J. A. (2021). The Impact of Disease Comorbidities in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 13:631770. doi:10.3389/fnagi.2021.631770.
 - 139) 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(1):233-52. doi: 10.1007/s00702-012-0877-9.
 - 140) Salkovic-Petrisic, M., Tribl, F., Schmidt, M., Hoyer, S. & Riederer, P. (2006). Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signaling pathway. *J Neurochem.* 96(4):1005-15. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03637.x.
 - 141) Saré, R. M., Cooke, S.K., Krych, L., Zerfas, P.M., Cohen, R.M. & Smith, C. B. (2020). Behavioral Phenotype in the TgF344-AD Rat Model of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 14:601. doi: 10.3389/fnins.2020.00601.
 - 142) Schiepers, O. J., Wichers, M. C. & Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29(2):201-17. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.11.003.
 - 143) Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry.* 122(5):509-22. doi: 10.1176/ajp.122.5.509.
 - 144) Schöll, M., Lockhart, S. N., Schonhaut, D. R., O'Neil, J. P., Janabi, M., Ossenkoppele, R., Baker, S. L., Vogel, J. W., Faria, J., Schwimmer, H. D., Rabinovici, G. D. & Jagust, W. J. (2016). PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron.* 89(5):971-982. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.028.

- 145) Shachar, I. & Karin, N. (2013). The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol.* 93(1):51-61. doi: 10.1189/jlb.0612293.
- 146) Shaftel, S. S., Kyrkanides, S., Olschowka, J. A., Miller, J. N., Johnson, R. E. & O'Banion, M. K. (2007). Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J Clin Invest.* 117(6):1595-604. doi: 10.1172/JCI31450.
- 147) Shanazz, K., Dixon-Melvin, R., Bunting, K. M., Nalloor, R. & Vazdarjanova, A. I. (2021). Light-dark open field (LDOP): a novel task for sensitive assessment of anxiety. *J Neurosci Methods.* 363:109325. doi:10.1016/j.jneumeth.2021.109325.
- 148) Shi, J. Q., Shen, W., Chen, J., Wang, B.-R., Zhong, L.-L., Zhu, Y.-W., ... & Zhang, Y. D. (2011). Anti-TNF- α reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cells in the APP/PS1 transgenic mouse brains. *Brain Research*, 1368, 239–247.
- 149) Sochocka, M., Ochnik, M., Sobczyński, M., Orzechowska, B. & Leszek, J. (2022). Sex Differences in Innate Immune Response of Peripheral Blood Leukocytes of Alzheimer's Disease Patients. *Arch Immunol Ther Exp.* 70(1):16. doi: 10.1007/s00005-022-00653-w.
- 150) Souza, L. C., Jesse, C. R., de Gomes, M. G., Viana, C. E., Mattos, E., Silva, N. C. & Boeira, S. P. (2017). Intracerebroventricular administration of streptozotocin as an experimental approach to depression: evidence for the involvement of proinflammatory cytokines and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Neurotox Res.* 31(4):464-477. doi:10.1007/s12640-016-9691-8.
- 151) Steinberg, M., Shao, H., Zandi, P., Lyketsos, C. G., Welsh-Bohmer, K. A., Norton, M. C., Breitner, J. C., Steffens, D. C. & Tschanz, J. T. (2008). Point and 5-year period prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia: the Cache County Study. *Int J Geriatr Psychiatry.* 23(2):170-7. doi: 10.1002/gps.1858.
- 152) Sun, Y., Ma, J., Li, D., Li, P., Zhou, X., Li, Y., He, Z., Qin, L., Liang, L. & Luo, X. (2019). Interleukin-10 inhibits interleukin-1 β production and inflammasome activation of microglia in epileptic seizures. *J Neuroinflammation.* 16(1):66. doi: 10.1186/s12974-019-1452-1.
- 153) Sutcliffe, J. S., Marshall, K. M., & Neill, J. C. (2007). Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat.

- 154) Sutinen, E. M., Pirttilä, T., Anderson, G., Salminen, A. & Ojala, J. O. (2012). Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid- β production in human neuron-like cells. *J Neuroinflammation*. 9:199. doi: 10.1186/1742-2094-9-199.
- 155) Tachida, Y., Saito, Y., & Saito, T. (2008). Interleukin-1 β up-regulates TACE to enhance α -cleavage of amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells and primary cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, 107(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05127.x>
- 156) Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- 157) Temel, L. J., Boothman, A., Blokland, P. J., Magill, H. W. M., Steinbusch, V., Visser-Vandewalle. & Sharp, T. (2007). Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (43) 17087-17092, <https://doi.org/10.1073/pnas.0704144104>.
- 158) Tonelli, L. H., Stiller, J., Rujescu, D., Giegling, I., Schneider, B., Maurer, K., Schnabel, A., Möller, H. J., Chen, H. H. & Postolache, T. T. (2008). Elevated cytokine expression in the orbitofrontal cortex of victims of suicide. *Acta Psychiatrica Scand.* 117(3):198-206. doi: 10.1111/j.1600-0447.2007.01128.x.
- 159) Urbanavicius, J., Lagos, P., Torterolo, P. & Scorza, C. (2014). Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time course, dose dependence, effects on anxiety-related behaviors, and reversion by nortriptyline. *Behav. Pharmacol.* 25 (4), 316–324 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.11.010>.
- 160) Urbanavicius, J., Fabius, S., Roncalho, A., Joca, S., Torterolo, P. & Scorza, C. (2019). Melanin-concentrating hormone in the Locus Coeruleus aggravates helpless behavior in stressed rats. *Behav Brain Res.* 374:112120. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112120.
- 161) van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., et al. (2023). Lecanemab in early alzheimer's disease. *N Engl J Med.* (388): 9-21. doi:10.1056/NEJMoa2212948.

- 162) Wang, J. H., Wu, Y. J., Tee, B. L. & Lo, R. Y. (2018). Medical Comorbidity in Alzheimer's Disease: A Nested Case-Control Study. *J Alzheimers Dis.* 63(2):773-781. doi: 10.3233/JAD-170786.
- 163) Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem.* (101):1172-1184. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x
- 164) Wang, M. M., et al. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0100-4>
- 165) Waters, A., Society for Women's Research Alzheimer's Disease Network., & Laitner, M. H. (2021). Biological sex differences in Alzheimer's preclinical research: a call to action. *Alzheimers Dement.* 7(1):e12111. doi: 10.1002/trc2.12111.
- 166) Wautier J. L. & Wautier, M. P. (2023). Pro- and Anti-Inflammatory Prostaglandins and Cytokines in Humans: *A Mini Review*. *Int J Mol Sci.* 24(11):9647. doi: 10.3390/ijms24119647.
- 167) World Health Organization. (2025). *Dementia*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- 168) Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 25(2), 181–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>
- 169) Yu, D. T., Li, R. X., Sun, J. R., Rong, X. W., Guo, X. G. & Zhu, G. D. (2021). Global mortality, prevalence and disability-adjusted life years of Alzheimer's disease and other dementias in adults aged 60 years or older, and the impact of the COVID-19 pandemic: a comprehensive analysis for the global burden of disease 2021. *BMC Psychiatry.* 25(1):503. doi:10.1186/s12888-025-06661-2.
- 170) Zabet, G. C., Medeiros, E. B., Macarini, B. M. N., Peruchi, B. B., Keller, G. S., Lídio, A. V., Boaventura, A., de Jesus, L. C., de Bem Silveira, G., Silveira, P. C. L., Chede, B. C., Réus, G. Z. & Budni, J. (2024). The involvement of neuroinflammation in an animal model of dementia and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 133:110999. doi: 10.1016/j.pnpbp.2024.110999.
- 171) Zhang, W., Wang, D., Montgomery, R. & Ziegler, J. (2010). Interleukin-1 α induces proinflammatory cytokines and activates ERK, p38, JNK, PI 3-kinase/Akt, and NF- κ B pathways in human myocardial fibroblasts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 299(3), H880–H891.

- 172) Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain.* 4, 3. doi: 10.1186/1756-6606-4-3
- 173) Zhao, Q. F., Tan, L., Wang, H.F., Jiang, T., Tan, M.-S., Tan, L., Xu, W., Li, J. Q., Wang, J., Lai, T. J. & Yu, J.T. (2016). The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 190, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.09.069>pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.
- 174) Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* (57): 178-1201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003.

11. ANEXOS

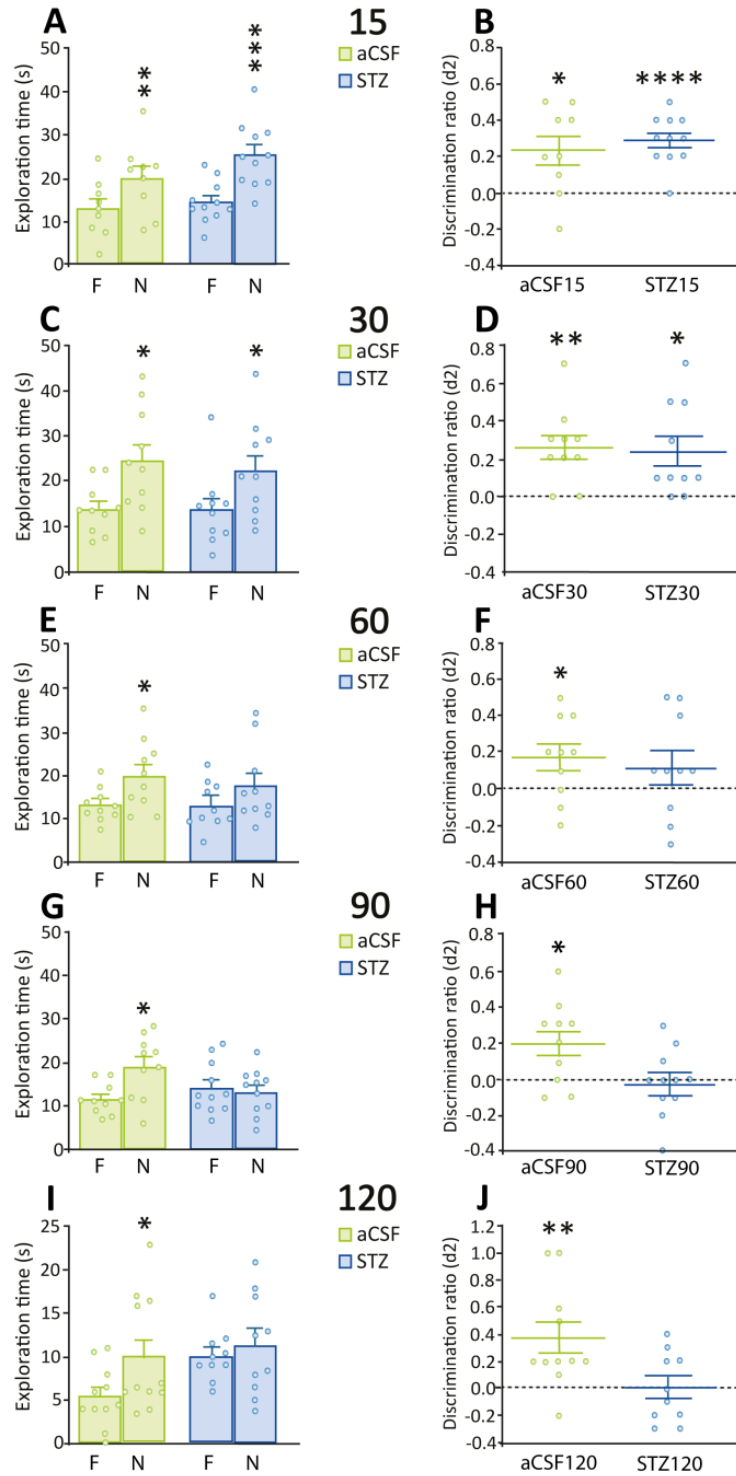


Figura 1. Tiempo total de exploración del objetos familiar (F) y novedoso (N) e índice de discriminación d2 durante el ensayo de retención del NOR en machos evaluados 15 (A, B), 30 (C, D), 60 (E, F), 90 (G, H) o 120 días (I, J) luego de la administración i.c.v de LCRa (aCSF) o STZ. Media + EEM. Test de t-student. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. Extraída de Niño-Rivero et al., 2025.