

# Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Médicas



---

## **TERAPIA CELULAR Y GÉNICA CON TIMULINA E IGF-1 EN MODELOS ANIMALES DE NEUROINFLAMACIÓN**

---

**AUTORA: LIC. MARÍA FLORENCIA ZAPPA VILLAR**

**DIRECTORA: Dra. Paula C. Reggiani**

**CO-DIRECTORES: Dr. Rodolfo G. Goya y Dr. Gustavo R. Morel**

**Instituto De Investigaciones Bioquímicas De La Plata  
`Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner`  
Facultad De Ciencias Médicas - Universidad Nacional De La Plata**

**2018**

## RECONOCIMIENTOS

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

A las Instituciones que han financiado mi trabajo de investigación:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Ministerio de Ciencia y Técnica (MinCyT)
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyT)
- Organización Internacional de Investigación del Cerebro (IBRO)
- Fundación de Apoyo a la Investigación de Río de Janeiro (FAPERJ)
- Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO)

A la Dra. Gloria M. Cónsole y a los integrantes de la Cátedra de Histología y Embriología B, FCM-UNLP.  
A los miembros de la Cátedra de Patología B, FCM-UNLP.

Al Dr. Sergio T. Ferreira y a todos los integrantes del Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

A la Dra. Mariana G. García del Laboratorio de Terapia Génica, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires.

A los mentores de la Escuela de Neurociencias de la Universidad McGill, Canadá: Dr. Albert J. Aguayo, Dr. Ante L. Padjen, Dra. Melissa Vollrath, Dr. David Ragsdale y Dr. Ellis Cooper

## AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas, el desarrollo de la presente Tesis Doctoral constituye un logro compartido con muchas personas que han contribuido con este trabajo a lo largo de estos años. Es a ellas a quienes dirijo este pequeño apartado.

En primer lugar, a mi directora, Dra. Paula C. Reggiani, por su gran confianza y compromiso para conmigo. Por enseñarme todo sin verticalidades y alentarme a crecer, apoyando mis debilidades y potenciando mis virtudes. Gracias por demostrarme ser una directora con quien puedo contar, tanto profesional como personalmente.

A mis co-directores:

- Dr. Rodolfo G. Goya, por abrirme las puertas de su laboratorio y ayudarme a comprender el mundo de la ciencia.
- Dr. Gustavo R. Morel, por acompañar mi crecimiento académico y estar siempre dispuesto a compartir sus conocimientos con una gran amabilidad.

A mis excelentes compañeros de equipo, Dr. Joaquín Pardo, Natalia Scelsio, Lucía Trípodi y Juliette López Hanotte, por su amistad y compromiso. Gracias por remar juntos en la misma dirección.

A todos los integrantes del INIBIOLP y de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, FCM-UNLP. Tuve el agrado de conocer aquí a grandes personas y aprender mucho de ellas. Muy especialmente a mis compañeros de Laboratorio, presentes y pasados:

- Dra. María José Bellini, Dra. Claudia Hereñú, Dra. Andrea Pereyra, Ignacio Schwerdt, Yolanda Sosa y Oscar Vercellini.
- A mi querido grupo del altillo, Eugenia Falomir Lockhart, Araceli Bigres, Marianne Lehmann, Franco Dolcetti, Martina Canatelli Mallat y Priscila Chiavellini.

Es reconfortante tener amigos en el lugar de trabajo y encontrar siempre un abrazo y un mate disponibles. Mejor aún, es elegir seguir compartiendo momentos juntos por fuera de las paredes del Laboratorio, donde las risas y las birras nos unen.

Finalmente, mi mayor agradecimiento a mi familia:

- A Manuel Orbea, la persona más importante en mi vida, quien me sorprende a diario con su amor y alegría. Gracias por iluminarme siempre.
- A mis padres, Lelia Villar y José Luis Zappa, mis grandes ejemplos de solidaridad y esfuerzo. Gracias por apoyarme en mis decisiones y alentarme con tanto amor.
- A mis adorados hermanos, Verónica, Luis y Cecilia, por ser incondicionales. Gracias Ceu por estar firme a mi lado en esta etapa y ser mi cómplice.
- A mis hermanas de la vida. Con ustedes no hay distancias porque caminan conmigo, atentas a cada paso. Gracias por su inmejorable amistad.
- A mis sobrinos y ahijados, por llenarme el corazón y recordarme las cosas importantes de la vida.

A todos... **MUCHAS GRACIAS.**

*Dedicada a la memoria de mi querida abuela Esperia,  
por su inmensa confianza en mí.*

*El motor de la ciencia es la curiosidad con las preguntas constantes: “¿Y eso cómo es?”, “¿en qué consiste?”, “¿cómo funciona?”. Y lo más fascinante es que cada respuesta trae consigo nuevas preguntas. En eso los científicos le llevamos ventaja a los exploradores: cuando creemos haber llegado a la meta anhelada, nos damos cuenta de que lo más interesante es que hemos planteado nuevos problemas para explorar.*

**César Milstein (Argentina, 1927 – Reino Unido, 2002)**

**Premio Nobel de Medicina 1984**

## TRABAJOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Parte de los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido publicados en artículos de revistas científicas internacionales con referato:

MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY IMPROVES SPATIAL MEMORY AND DIMINISHED MICROGLIAL ACTIVATION IN AGING RATS

**Zappa Villar MF**, Lehmann M, García MG, Mazzolini G, Morel GR, Cónsole GM, Podhajcer O, Reggiani PC, Goya RG.

Behav. Brain Res. Under review, Nov/2018.

MESENCHYMAL STEM CELLS THERAPY IMPROVED THE STREPTOZOTOCIN-INDUCED HIPPOCAMPAL AND BEHAVIORAL IMPAIRMENT IN RATS

**Zappa Villar MF**, López Hanotte J, Pardo J, Morel GR, Mazzolini G, García MG, Reggiani PC.

Neurobiol. Aging. Under review, Nov/2018.

INTRACEREBROVENTRICULAR STREPTOZOTOCIN INDUCES IMPAIRED BARNES MAZE SPATIAL MEMORY AND REDUCES ASTROCYTE BRANCHING IN THE CA1 AND CA3 HIPPOCAMPAL REGIONS

**Zappa Villar MF**, López Hanotte J, Falomir Lockhart E, Trípodi LS, Morel GR, Reggiani PC.

J Neural Transm (Vienna). 2018 Sep 22. doi: 10.1007/s00702-018-1928-7.

A NEW ADENOVECTOR SYSTEM FOR IMPLEMENTING THYMULIN GENE THERAPY FOR INFLAMMATORY DISORDERS

**Zappa Villar MF**, López León M, Pardo J, Costa M, Crespo R, Dardenne M, Goya RG, Reggiani PC. Mol Immunol. 2017 Jul;87:180-187. doi: 10.1016/j.molimm.2017.04.014. Epub 2017 May 11.

THE THYMULIN-LACTOTROPIC AXIS IN RODENTS: THYMECTOMY, IMMUNONEUTRALIZATION AND GENE TRANSFER STUDIES

Martines EV, Reggiani PC, Camihort G, Luna G, **Zappa MF**, Brown OA, Goya RG, Cónsole GM. Neuroimmunomodulation. 2013;20(5):256-63. doi: 10.1159/000346477. Epub 2013 Jul 9.

PHISIOLOGY, MOLECULAR BIOLOGY AND THERAPEUTIC POTENCIAL OF THE THYMIC PEPTIDE THYMULIN.

Pardo J, Schwerdt JI, Reggiani PC, **Zappa MF**, Pereyra AS, Brown OA, Goya RG. Physiological Mini-Reviews. 2012;6(1):6-12.

Parte de los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido comunicados en reuniones científicas nacionales e internacionales:

INTRAVENOUS MESENCHYMAL STEM CELLS ADMINISTRATION AS A NEUROPROTECTIVE THERAPY IN A RAT MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE (Poster). **Zappa Villar MF**, Lopez Hanotte J, Pardo J, Morel GR, García MG, Reggiani PC. **48th Annual Meeting, Society for Neuroscience 2018**. San Diego, CA, Estados Unidos.

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1 EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (Disertante). **Zappa Villar MF**, Lopez Hanotte J, Morel GR, Trípodi LS, García MG, Reggiani PC. **XXI Congreso Argentino de la Enfermedad de Alzheimer y otros Trastornos Cognitivos 2018**. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina.

IGF-1 GENE TRANSFER PROTECTS AGAINST A $\beta$  OLIGOMER-INDUCED NEURONAL DAMAGE AND MEMORY IMPAIRMENT IN MICE (Poster). Sellés MC\*, **Zappa Villar MF\***, Reggiani PC, Ferreira ST. **47th Annual Meeting, Society for Neuroscience 2017**. Washington, DC, Estados Unidos. \*Igual colaboración.

NEUROPROTECTIVE CELL THERAPY IN A SPORADIC ALZHEIMER RAT MODEL (Poster). **Zappa Villar MF**, Morel GR, Trípodi LS, Lopez Hanotte J, García MG, Reggiani PC. **11th Annual Canadian Neuroscience Meeting 2017**. Montreal, QC, Canadá.

THERAPEUTIC POTENTIAL OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I GENE THERAPY IN ANIMAL MODELS OF NEURODEGENERATION (Young Investigators Symposia). **Zappa Villar MF**, Morel GR, García MG, Pardo J, López León M, Trípodi LS, Mazzolini G, Goya RG, Reggiani PC. **2nd Federation of Latin American and Caribbean Neuroscience Societies (FALAN) Congress 2016**. Buenos Aires, Argentina.

NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 IN A RAT MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE (Poster). **Zappa Villar MF**, López Hanotte J, Trípodi LS, Morel GR, Reggiani PC. **XXXII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN) 2017**. Mar del Plata, Argentina.

ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL HIPOCAMPO CEREBRAL DE ANIMALES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL (Poster). **Florencia Zappa Villar MF**, López Hanotte J, Pardo J, Crespo R, Morel GR, Trípodi LS, Cónsole GM, Reggiani PC. **Jornadas de Presentación de Trabajos Medicina 2017, FCM – UNLP 2017**. La Plata, Argentina.

THERAPEUTIC POTENTIAL OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS IN A SPORADIC ALZHEIMER RAT MODEL (Poster). **Zappa Villar MF**; Morel GR; Trípodi LS; García M; Goya RG; Reggiani PC. **XXX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN) 2015**. Mar del Plata, Argentina.

SISTEMA GÉNICO REGULABLE BIDIRECCIONAL PARA TIMULINA Y GFP: CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DE SU FUNCIONALIDAD Y REGULABILIDAD (Poster). **Zappa Villar M.**; López León M.; Pardo J.; Reggiani P. **LVIII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) 2013**. Mar del Plata, Argentina.

## INDICE

ABREVIATURAS .....	12
RESUMEN .....	15
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>18</b>
1.1 Envejecimiento .....	18
1.1.1 Epidemiología .....	18
1.1.2 Envejecimiento cerebral no patológico.....	19
1.1.3 Alteraciones cognitivas .....	19
1.1.4 Señalización de la insulina y metabolismo energético cerebral.....	20
1.1.5 Neuroinflamación .....	21
1.1.6 Comparación de la fisiopatología entre el envejecimiento cerebral no patológico y la Enfermedad de Alzheimer .....	24
1.2 Enfermedad de Alzheimer .....	25
1.2.1 Generalidades .....	25
1.2.2 Epidemiología y costos .....	25
1.2.3 Factores genéticos y de riesgo .....	26
1.2.4 Patología.....	28
1.3 Modelos animales .....	34
1.3.2 Modelo animal de la enfermedad de Alzheimer esporádica: STZ-icv.....	34
1.3.3 Modelos experimentales generados por oligómeros de $\beta$ A .....	38
1.4 Estrategias terapéuticas .....	40
1.4.1 Células madre: conceptos generales.....	40
1.4.2 Terapia génica .....	47
1.4.3 Factores Tróficos .....	53
<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
2.1 Hipótesis .....	60
2.2 Objetivos específicos.....	60
<b>CAPÍTULO III: TERAPIA CELULAR EN EL MODELO <i>IN VIVO</i> DE ENVEJECIMIENTO, LA RATA SENIL</b>	
<b>(Objetivo específico 1) .....</b>	<b>62</b>
3.1 Reseña introductoria.....	62
3.2 Materiales y métodos .....	62
3.2.1. Aislamiento y caracterización de las hBM-MSCs .....	62
3.2.2. Marcación fluorescente de las MSCs .....	63
3.2.3. Animales y diseño experimental .....	63
3.2.4. Diseño del estudio temporal .....	64
3.2.5. Inyecciones estereotáxicas.....	65
3.2.6. Evaluación de la memoria espacial.....	65
3.2.7. Eutanasia y procesamiento de los cerebros .....	67
3.2.8. Inmunohistoquímica .....	68
3.2.9. Obtención y análisis de imágenes.....	68
3.2.10. Análisis de neuroblastos.....	68
3.2.11. Análisis de células microgliales .....	69
3.2.12. Análisis de Western Blot .....	70
3.3 Resultados .....	71
3.3.1 Estudio temporal de las MSCs en los ventrículos cerebrales .....	71
3.3.2 Efecto del tratamiento con MSCs en la cognición de las ratas seniles .....	72

3.3.3 Efecto del tratamiento con MSCs en el hipocampo de ratas seniles .....	75
3.4 Discusión.....	77
<b>CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO <i>IN VIVO</i> DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS (Objetivo específico 2) .....</b>	
4.1 Reseña Introductoria.....	81
4.2 Materiales y métodos .....	81
4.2.1 Animales .....	81
4.2.2 Procedimientos quirúrgicos.....	81
4.2.3 Evaluación de la memoria espacial .....	82
4.2.4 Evaluación de la memoria de reconocimiento .....	83
4.2.5 Diseño experimental .....	83
4.2.6 Procesamiento de los cerebros.....	84
4.2.7 Inmunohistoquímica .....	85
4.2.8 Obtención y análisis de imágenes.....	85
4.2.9 Volumen del <i>Stratum Radiatum</i> .....	85
4.2.10 Análisis de neuronas maduras.....	86
4.2.11 Análisis de células microgliales.....	86
4.2.12 Análisis de células astrogliales.....	86
4.2.13 Análisis de Western Blot .....	87
4.2.14 Análisis estadístico .....	87
4.3 Resultados .....	87
4.3.1 Reducción del peso corporal en las ratas tratadas con STZ .....	87
4.3.2 Efecto de la administración de STZ-icv en el aprendizaje y la memoria de referencia espacial en ratas .....	88
4.3.3 Deterioro de la memoria de reconocimiento en ratas tratadas con STZ-icv .....	91
4.3.4 Cambios morfológicos en el hipocampo de ratas tratadas con STZ-icv.....	92
4.3.5 Efecto del tratamiento STZ-icv en los niveles proteicos de PPA, $\beta$ A y pTau/Tau en el hipocampo de las ratas .....	98
4.4 Discusión.....	99
<b>CAPÍTULO V: TERAPIA CELULAR EN EL MODELO <i>IN VIVO</i> DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS (Objetivo específico 3) .....</b>	
5.1 Reseña Introductoria.....	106
5.2 Materiales y métodos .....	106
5.2.1 Animales .....	106
5.2.2 Aislamiento y caracterización de las hUCPVCs .....	107
5.2.3 Inyecciones estereotáxicas e intravenosas .....	107
5.2.4 Comportamiento exploratorio y de ansiedad .....	107
5.2.5 Evaluación de la memoria espacial .....	108
5.2.6 Comportamiento defensivo de enterramiento .....	108
5.2.7 Comportamiento depresivo .....	108
5.2.8 Diseño experimental .....	109
5.2.9 Procesamiento de los cerebros, inmunohistoquímica y análisis de imágenes .....	109
5.2.10 Análisis estereológicos en el hipocampo dorsal .....	110
5.2.11 Análisis de Western Blot .....	110
5.2.12 Análisis estadístico .....	110

5.3 Resultados .....	110
5.3.1. Restauración del comportamiento exploratorio y la ansiedad .....	110
5.3.2. Restauración del aprendizaje y la memoria espacial.....	111
5.3.3. Evaluación del comportamiento innato de enterramiento defensivo y del comportamiento depresivo .....	113
5.3.4. Evaluación de volumen, las neuronas maduras y la neurogénesis en el hipocampo...	114
5.3.5. Cambios en la microgliosis y la astrogliosis en el hipocampo .....	116
5.3.6. Niveles de proteínas sinápticas en el hipocampo.....	118
5.3.7. Identificación de correlaciones entre comportamiento, morfología y expresión de proteínas sinápticas en el hipocampo .....	119
5.4. Discusión.....	120
<b>CAPÍTULO VI: TRANSFERENCIA GÉNICA DE IGF-1 EN MODELOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, INDUCIDOS POR OLIGÓMEROES DEL PÉPTIDO BETA-AMIODE</b>	
(Objetivo específico 4) .....	126
6.1 Reseña introductoria.....	126
6.2 Materiales y Métodos .....	127
6.2.1 Preparación y caracterización de los O $\beta$ As .....	127
6.2.2 Cultivos neuronales.....	127
6.2.3 Medición de viabilidad celular.....	128
6.2.4 Medición de las especies reactivas del oxígeno .....	129
6.2.5 Inmunocitoquímica y marcación con faloidina .....	129
6.2.6 Animales e inyecciones intracerebroventriculares .....	130
6.2.7 Evaluación de la memoria de reconocimiento .....	131
6.2.8 Evaluación del comportamiento depresivo.....	132
6.2.9 Diseño experimental .....	132
6.2.10 Procesamiento de los cerebros .....	133
6.2.11 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....	133
6.2.12 Obtención de imágenes.....	133
6.2.13 Volumen del Stratum Radiatum y del Dentate Hilus .....	134
6.2.14 Análisis de neuroblastos y células gliales hipocampales .....	134
6.2.15 Análisis de Western Blot para IGF-1.....	134
6.2.16 Análisis estadístico .....	134
6.3 Resultados .....	135
6.3.1 Viabilidad de los cultivos neuronales transducidos con el vector adenoviral y expuestos a O $\beta$ As.....	135
6.3.2 Niveles del receptor de IGF-1 no alterados en la superficie neuronal por exposición a O $\beta$ As <i>in vitro</i> .....	135
6.3.3 Prevención del aumento de especies reactivas del oxígeno inducido por los O $\beta$ As <i>in vitro</i> .....	136
6.3.4 Protección parcial de la pérdida de espinas dendríticas inducida por los O $\beta$ As <i>in vitro</i> .....	137
6.3.5 Reducción de la unión de O $\beta$ As a las neuronas <i>in vitro</i> .....	137
6.3.6 Protección <i>in vivo</i> de la pérdida de memoria en ratones expuestos a O $\beta$ As.....	138
6.3.7 Evaluación del comportamiento depresivo en ratones expuestos a O $\beta$ As .....	139
6.3.8 Aumento <i>in vivo</i> de los niveles de IGF-1 en el hipocampo.....	140
6.3.9 Cambios morfológicos en el hipocampo de los ratones expuestos a O $\beta$ As .....	141
6.4 Discusión.....	144

<b>CAPÍTULO VII: CONSTRUCCIÓN DE UN NUEVO SISTEMA DE ADENOVECTORES PARA IMPLEMENTAR TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA EN TRASTORNOS INFLAMATORIOS (Objetivo específico 5) .....</b>	<b>148</b>
7.1 Reseña introductoria.....	148
7.2 Materiales y métodos .....	148
7.2.1 Construcción de un sistema bidireccional regulable de dos adenovectores .....	148
7.2.2 Caracterización del sistema <i>in vitro</i> .....	150
7.2.3 Animales y procedimiento <i>in vivo</i> .....	151
7.2.4 Expresión de hGFP .....	154
7.2.5 Bioensayo de timulina.....	154
7.2.6. Análisis estadístico .....	155
7.3 Resultados .....	155
7.3.1 Estructura y función del sistema bivectorial para timulina y hGFP .....	155
7.3.2 Caracterización .....	156
7.3.3 Caracterización del sistema bivectorial <i>in vivo</i> .....	158
7.4 Discusión.....	160
<b>CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>163</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>166</b>

## ABREVIATURAS

<b>3V:</b> tercer ventrículo	<b>EAF:</b> enfermedad de Alzheimer familiar
<b>ACh:</b> acetilcolina	<b>ER:</b> endonucleasa de restricción
<b>AChE:</b> enzima acetilcolinesterasa	<b>EROs:</b> especies reactivas del oxígeno
<b>Ad:</b> adenovirus	<b>ETV:</b> sistema experimental bivectorial
<b>ASF:</b> fracción de muestreo del área (del inglés ‘area sampling fraction’)	<b>FLP:</b> recombinasa de levadura (característica de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
<b>AT:</b> ensayo de adquisición (del inglés ‘acquisition trial’)	<b>FRT:</b> sitios de reconocimiento para la recombinasa FLP de levadura
<b>Az:</b> azatioprina	<b>FS:</b> nado forzado (del inglés ‘forced swimming’)
<b>BDNF:</b> factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés ‘brain-derived neurotrophic factor’)	<b>FSL:</b> modelo genético de depresión en ratas (del inglés ‘flinders sensitive line’)
<b>BM:</b> laberinto de Barnes (del inglés ‘Barney Maze’)	<b>FTS:</b> factor tímico sérico
<b>BSA:</b> albúmina sérica bovina (del inglés ‘bovine serum albumin’)	<b>GAD:</b> ácido glutámico decarboxilasa (de inglés ‘glutamic acid decarboxylase’)
<b>CA:</b> <i>Cornu Ammonis</i>	<b>GCL:</b> capa celular granular (del inglés ‘granule cell layer’)
<b>CET:</b> células epiteliales tímicas	<b>GD:</b> giro dentado
<b>ChAT:</b> enzima colina acetiltransferasa	<b>GFAP:</b> proteína fibrilar acídica de la glía (del inglés ‘glial fibrillary acidic protein’)
<b>CICUAL:</b> Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio	<b>GLUT2:</b> transportador de glucosa del tipo 2
<b>CTV:</b> control del sistema bivectorial	<b>GS:</b> sector meta (del inglés ‘goal sector’)
<b>DAB:</b> 3,3-diamino bencidina tretrahidrocloruro	<b>hBM-MSCs:</b> células mesenquimales derivadas de médula ósea humana (del inglés ‘human bone marrow mesenchymal stem cells’)
<b>DCX:</b> doblecortina	<b>HEK 293:</b> células embrionarias de riñón humano 293 (del inglés ‘human embryonic kidney cells’)
<b>DEx:</b> día experimental	<b>hGFP:</b> proteína verde fluorescente humanizada (del inglés ‘humanized green fluorescent protein’)
<b>DH:</b> <i>Dentate Hilus</i>	<b>HLA:</b> antígeno leucocitario humano
<b>DIV:</b> días <i>in vitro</i>	<b>HRP:</b> peroxidasa de rábano picante (del inglés ‘Horse Radish Peroxidase’)
<b>DM:</b> diabetes <i>Mellitus</i>	
<b>DOX:</b> doxiciclina	
<b>EA:</b> enfermedad de Alzheimer	
<b>EAE:</b> enfermedad de Alzheimer esporádica	

**HSCs:** células madre hematopoyéticas (del inglés ‘hematopoietic stem cells’)

**hUC-MSCs:** células mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical humano (del inglés ‘human umbilical cord mesenchymal stem cells’)

**hUCPVCs:** células perivasculares de cordón umbilical humano (del inglés ‘human umbilical cord perivascular cells’)

**Iba-1:** molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (del inglés ‘Ionized calcium binding adaptor molecule 1’)

**icv:** intracerebroventricular

**IGF-1:** factor de crecimiento símil insulina 1 (del inglés ‘insulin-like growth factor 1’)

**IGFBPs:** proteínas de unión a los factores de crecimiento símil insulina (del inglés ‘IGF-binding protein’)

**IHQ:** inmunohistoquímica

**IL:** interleucina

**im:** intramuscular

**ip:** intraperitoneal

**iPSCs:** células de pluripotencialidad inducida (del inglés ‘induced pluripotent stem cells’)

**IRA:** área inmunorreactiva (del inglés ‘immunoreactive area’)

**IRS-1:** sustrato del receptor de insulina 1 (del inglés ‘insulin receptor substrate 1’)

**ISCT:** Sociedad Internacional de Terapia Celular (del inglés ‘International Society for Cellular Therapy’)

**ITRs:** repeticiones terminales invertidas (del inglés ‘inverted terminal repeat’)

**iv:** intravenosa

**MB:** enterramiento de canicas (del inglés ‘marble burying’)

**MCS:** sitio de clonación múltiple (del inglés ‘multiple cloning site’)

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés ‘major histocompatibility complex’)

**ML:** capa molecular (del inglés ‘molecular layer’)

**MOI:** multiplicidad de infección (del inglés ‘multiplicity of infection’)

**MSCs:** células madre mesenquimales (del inglés ‘mesenchymal stem cells’)

**MWM:** laberinto de agua de Morris (del inglés ‘Morris water maze’)

**NF-κB:** factor nuclear kappa B (del inglés ‘nuclear factor kappa B’)

**NOR:** test de reconocimiento del objeto nuevo (del inglés ‘novel object recognition’)

**Nude:** ratones congénitamente atípicos

**OF:** campo abierto (del inglés ‘open field’)

**ONF:** ovillos neurofibrilares

**OβAs:** oligómeros derivados del péptido beta-amiloide

**PB:** solución buffer fosfato (del inglés ‘phosphate buffered saline’)

**PBS:** solución buffer fosfato salina (del inglés ‘phosphate buffered saline’)

**PC:** peso corporal

**PFA:** paraformaldehído

**pfu:** unidades formadoras de placa (del inglés ‘plaque-forming unit’)

**PminCMV:** promotor mínimo del citomegalovirus (por sus siglas en inglés, ‘murine Cytomegalovirus promoter’)

**PPA:** proteína precursora de amiloide

**PS:** placas seniles

**PSN:** presenilina

**PT:** ensayo de prueba (del inglés ‘probe trial’)

<b>pTau:</b> proteína Tau hiperfosforilada	<b>SV40:</b> señal de poliadenilación del virus simio 40
<b>RAd:</b> adenovirus recombinante (del inglés 'recombinant adenovirus')	<b>SYP:</b> sinaptofisina
<b>RI:</b> receptor de insulina	<b>SYT:</b> sinaptotagmina
<b>R-IGF-1:</b> receptor del factor de crecimiento símil insulina 1	<b>TA:</b> músculo tibial anterior (de inglés 'tibialis anterior muscles')
<b>SD:</b> <i>Sprague Dawley</i>	<b>TBS-T:</b> solución buffer salina con Tris/Tween-20 (de inglés 'Tris Buffered Saline with Tween 20')
<b>SEM:</b> error estándar de la media (del inglés 'standard error of the mean')	<b>TNF<math>\alpha</math>:</b> factor de necrosis tumoral alfa (del inglés 'tumoral necrosis factor $\alpha$ ')
<b>SFB:</b> suero fetal bovino	<b>tsf:</b> fracción de muestreo del espesor (del inglés 'thickness sampling fraction')
<b>SGZ:</b> zona subgranular (de inglés 'subgranular zone')	<b>tTA:</b> proteína químérica reguladora
<b>SL:</b> <i>Stratum Lucidum</i>	<b>Tx:</b> timectomía/ timectomizado
<b>SLM:</b> <i>Stratum Lacunosum Moleculare</i>	<b>Veh:</b> vehículo
<b>SNC:</b> sistema nervioso central	<b>VIN:</b> vinculina
<b>SO:</b> <i>Stratum Oriens</i>	<b>VL:</b> ventrículos laterales
<b>SR:</b> <i>Stratum Radiatum</i>	<b>WB:</b> western blot
<b>ssf:</b> fracción de muestreo de secciones (del inglés 'section sampling fraction')	<b><math>\beta</math>A:</b> péptido beta amiloide
<b>STZ:</b> estreptozotocina	<b><math>\beta</math>-NGF:</b> factor neurotrófico beta del sistema nervioso (del inglés 'nerve growth factor')
<b>SV2:</b> proteína de vesícula sináptica 2	

## RESUMEN

El envejecimiento cognitivo y su expresión más devastadora, la enfermedad de Alzheimer (EA), representan un creciente desafío médico y socioeconómico que requiere vigorosos esfuerzos de investigación para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que intervienen el cerebro y para el desarrollo de estrategias terapéuticas. Más aún, la EA esporádica (EAE) es la patología neurodegenerativa más frecuente y se espera que el número de personas afectadas continúe creciendo de manera exponencial. Desafortunadamente no existe un tratamiento disponible que revierta o prevenga la muerte neuronal que resulta en el inevitable deterioro cognitivo de los pacientes con EA. Es por ello que, la combinación de un diagnóstico temprano y una terapia efectiva resulta imprescindible para frenar el progresivo aumento de casos dado por la mayor expectativa de vida.

Desde hace unos años, existe un creciente interés en el potencial de las células madre mesenquimales (MSCs) para implementar medicina regenerativa en el cerebro, ya que han demostrado actividades neurogénicas e inmunomoduladoras. En la presente Tesis Doctoral evaluamos en primer lugar, el efecto de la administración intracerebroventricular (icv) de MSCs derivadas de médula ósea humana (hBM-MSCs) en la memoria espacial y en la morfología del hipocampo de ratas seniles (27 meses). Después del tratamiento, el grupo senil tratado con MSCs mostró una mejora significativa en la memoria espacial, evaluada en el Laberinto de Barnes (BM). Respecto a la morfología del hipocampo, la terapia con MSCs aumentó el número de neuroblastos en el giro dentado, redujo el número de células microgliales reactivas y restauró la pérdida sináptica en comparación con los controles seniles. Llegamos a la conclusión de que las hBM-MSCs inyectadas icv son eficaces para mejorar la memoria espacial y algunas características cerebrales funcionales y morfológicas típicamente alteradas en ratas envejecidas.

Para contribuir al estudio de la EA es necesario disponer de modelos animales que recapitulen las principales características patológicas de esta enfermedad. La inyección icv de estreptozotocina (STZ) en ratas constituye un modelo prometedor, ya que los animales desarrollan un estado cerebral insulino-resistente y deficiencias cognitivas. Aunque numerosos estudios han descripto a este modelo como representativo de la EAE, aún se necesitan más estudios para caracterizarlo completamente. En el presente trabajo, evaluamos los efectos a corto plazo de la inyección de STZ-icv a dos dosis, 1 (STZ1) y 3 mg/kg (STZ3), sobre el comportamiento y la morfometría del hipocampo. Encontramos que, después de la administración de STZ-icv, las ratas STZ3, pero no las STZ1,

presentaban alteraciones en la memoria espacial en el BM y en la memoria de reconocimiento de objetos. Además, las ratas STZ3 mostraron una reducción del volumen y pérdida de neuronas del hipocampo, junto con un aumento de marcadores de microgliosis y astrogliosis (neuroinflamación). El análisis de Sholl reveló la vulnerabilidad de los astrocitos hipocampales a ambas dosis de STZ. En general, el presente estudio proporciona datos relevantes sobre este modelo de EAE en rata, en el cual solo la dosis alta de STZ induce lesiones neurodegenerativas severas y agudas, asociadas con un proceso inflamatorio.

En este modelo de EAE decidimos evaluar la terapia con MSCs puesto que obtuvimos resultados prometedores en los estudios en ratas seniles. Para ello, inyectamos crónicamente MSCs por vía intravenosa (iv). Comprobamos que la terapia celular aumentó el comportamiento exploratorio y de enterramiento defensivo, disminuyó la ansiedad y mejoró la memoria espacial, afectados por la STZ. Un hallazgo interesante es que la terapia celular rescató a los animales de la neurodegeneración, pero no revirtió la pérdida de neuroblastos inducidas por la STZ en el hipocampo. Además, la terapia celular disminuyó significativamente la microgliosis y la disfunción sináptica en el hipocampo. Concluimos que, bajo nuestro protocolo de inyección, la terapia iv con MSCs en ratas con STZ induce a nivel estructural, bioquímico y funcional una neuroprotección integral en el hipocampo que promueve claras mejoras comportamentales.

Otro modelo animal de EA, generado por la administración icv de oligómeros del péptido beta amiloide (O $\beta$ As) en ratones, fue utilizado en el presente trabajo de Tesis Doctoral. Evidencia considerable indica que los O $\beta$ As se acumulan en el cerebro con EA, y están implicados en la disfunción sináptica temprana y en el deterioro de la memoria en dicha enfermedad. Anteriormente, se ha establecido que la exposición de neuronas hipocampales a O $\beta$ As induce la internalización de los receptores de insulina (RI) y la inhibición del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), generando resistencia a la insulina neuronal. Aunque la insulina parece mejorar la cognición en los individuos controles y en las primeras etapas de la EA, los efectos protectores pueden no observarse en las últimas etapas de la enfermedad. Las posibles explicaciones para esto incluyen la eliminación de los RI de la superficie neuronal y el bloqueo de la señalización del RI debido a la inhibición de IRS-1 instigada por oligómeros. En nuestro estudio, hemos investigado si el factor de crecimiento símil insulina 1 (IGF-1) podría utilizarse para evitar el bloqueo de la señalización mediada por el RI y promover la activación alternativa de vías relacionadas con la insulina, protegiendo así a las neuronas del daño inducido por O $\beta$ As. Primero realizamos estudios *in vitro* que nos permitieron determinar

que la exposición a O $\beta$ As en cultivos de neuronas hipocampales no afectaba los niveles del receptor IGF-1 en la superficie celular. Para evaluar nuestra hipótesis empleamos *in vitro*, previo a la exposición a O $\beta$ As (500 nM), un vector adenoviral recombinante (RAd-IGF-1) que induce la sobreexpresión de IGF-1. A pesar de observar solo una ligera disminución en la pérdida de espinas dendríticas, la expresión de IGF-1 mediada por el RAd previno la unión de O $\beta$ As a las neuronas y la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno. A continuación, utilizamos un modelo *in vivo* en ratones para estudiar el impacto de la inyección icv de RAd-IGF-1, dos semanas antes de la infusión de O $\beta$ As-icv. Resulta de interés que, la sobre expresión del IGF-1 en el cerebro de los ratones protege contra el deterioro de la memoria de reconocimiento de objetos inducido por O $\beta$ As. Los resultados sugieren que la terapia génica con RAd-IGF-1 es una estrategia prometedora para proteger contra la neurodegeneración y el deterioro cognitivo inducido por los O $\beta$ As.

Finalmente, teniendo en cuenta que la neuroinflamación es una característica típica tanto del envejecimiento como en la EA, resulta interesante disponer de herramientas para su modulación. En el laboratorio hemos empleado terapia génica con el péptido tímico timulina basada en su rol neuroinmunoendocrino. Actualmente estamos interesados en explorar el potencial antiinflamatorio de la timulina en los modelos animales de neurodegeneración. Para ello, inicialmente, nos propusimos generar una herramienta biotecnológica que nos permita manipular la expresión de la timulina, así fue que construimos un sistema bidireccional regulable Tet-Off de dos vectores (que llamamos sistema bivectoral experimental, ETV), el cual expresa simultáneamente el gen sintético para timulina y el gen para proteína verde fluorescente humanizada (hGFP) y, además, el sistema control correspondiente. La expresión de los transgenes se desactiva en presencia del antibiótico doxiciclina (DOX). ETV se caracterizó *in vitro*, en diferentes líneas celulares, e *in vivo*, administrado icv y por vía intramuscular; en todos los casos ETV mostró inducir niveles elevados de timulina y ser eficientemente regulado por DOX. Por tanto, creemos que nuestro sistema bivectorial regulable es una herramienta molecular eficaz para implementar terapia génica antiinflamatoria con timulina, a corto y largo plazo, en modelos animales de inflamación aguda o crónica.

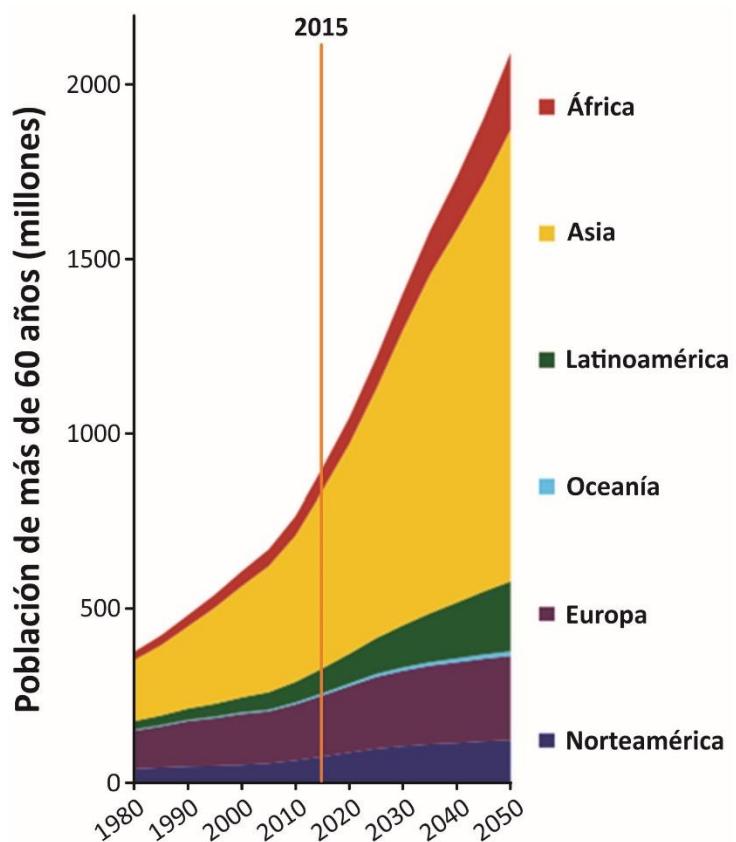
## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Envejecimiento

La población mundial está envejeciendo: la mayoría de los países del mundo están experimentando un aumento en el número y en la proporción de personas mayores. Esto es consecuencia de una mayor expectativa de vida debido a los avances de las ciencias médicas, entre otras razones socioeconómicas.

#### 1.1.1 Epidemiología

Según datos del informe de las Naciones Unidas «Perspectivas de la Población Mundial», en 2017 se estimaron cerca de mil millones de personas mayores de 60 años y se espera que el número se duplique para 2050 y triplique para 2100 (**Figura 1**). Este grupo de la población crece más rápidamente que los de personas más jóvenes (**World Population Prospects - United Nations, 2017**).



**Figura 1: Proyección del envejecimiento de la población mundial en personas de más de 60 años.** Programa de las Naciones Unidas para el Envejecimiento.

El análisis sobre el fenómeno de envejecimiento poblacional reporta en nuestro país un comportamiento similar al mundial. Según la Comisión Económica para América Latina, en 2017 los mayores de 60 años representaban el 15% y en 2030 alcanzarán el 18,3%. Por lo tanto, el futuro argentino debe considerar especialmente a las personas mayores y fomentar investigaciones que faciliten la toma de conciencia en nuestra sociedad de cara a este desafío (**OMS - Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud, 2015**).

### **1.1.2 Envejecimiento cerebral no patológico**

Como se mencionó anteriormente, ha habido un aumento constante en la esperanza de vida de la población en todo el mundo, que ha puesto en relieve los diversos problemas médicos y socioeconómicos de la población geriátrica. Esto ha llevado a un aumento en la investigación del envejecimiento tanto a nivel clínico como básico y, como es lógico, el envejecimiento del cerebro ha ocupado un lugar central en dichos estudios.

El envejecimiento cerebral se asocia con déficits cognitivos junto con alteraciones celulares y moleculares subyacentes que incluyen daño oxidativo, deterioro mitocondrial, modificaciones en el metabolismo de la glucosa y la energía, y neuroinflamación. Estos cambios progresan lentamente a lo largo de los años durante la vejez constituyendo lo que se denomina envejecimiento cerebral no patológico (**Poddar y col. 2018**). Finalmente, conlleva a un deterioro en la calidad de vida de las personas de edad, originando mayor morbilidad y eventualmente la necesidad de atención institucional (**Deary y col. 2009**). Además, el cerebro envejecido puede establecer un telón de fondo para el desarrollo de patologías tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), que se presenta con una pérdida devastadora de la memoria y la cognición junto con la pérdida neuronal difusa y los signos histopatológicos característicos (**Serrano-Pozo y col. 2011**). Los mecanismos de daño molecular del envejecimiento cerebral no patológico tienen muchos puntos en común con los de EA, lo que implica que un análisis detallado de los primeros puede conducir finalmente a una mejor comprensión de la patogénesis de la EA.

### **1.1.3 Alteraciones cognitivas**

El envejecimiento cerebral no patológico se asocia con deterioro cognitivo en humanos. En particular, la adquisición y retención de nuevos aprendizajes espaciales se ven negativamente afectadas (**Rosenbaum y col. 2012**). En ratas, se ha observado en el envejecimiento normal un deterioro significativo en la memoria de trabajo y de referencia espacial dependiente del hipocampo, evaluada

mediante el laberinto de agua de Morris (MWM) (**Gallagher, Burwell y Burchinal 1993; Vorhees y Williams 2006**). También se ha demostrado que la memoria espacial a largo plazo está deteriorada en ratones envejecidos según lo evaluado por la tarea de memoria de ubicación de objetos, mientras que la memoria de reconocimiento de objetos no se ve afectada (**Wimmer y col. 2012**). Sin embargo, existen estudios que demostraron que los animales envejecidos responden de manera heterogénea al deterioro de la memoria y en tareas de aprendizaje, por lo cual, se ha propuesto que el déficit cognitivo relacionado con la edad progres a diferentes velocidades en los distintos individuos (**Beas, Setlow y Bizon 2013**).

#### **1.1.4 Señalización de la insulina y metabolismo energético cerebral**

Antes de la década de los 80, se pensaba erróneamente que el sistema nervioso central (SNC) era insensible a la estimulación por insulina y que la captación de glucosa en el cerebro ocurría de forma independiente de la acción de la insulina. Después de las primeras descripciones de la presencia de insulina y de sus receptores en diversas regiones del cerebro, se comenzó a especular sobre cuál sería su origen y su rol en este órgano (**Havrankova, Roth y Brownstein 1983; Havrankova y col. 1978; Plum, Schubert y Brüning 2005**).

Estudios posteriores demostraron que la insulina periférica puede cruzar la barrera hematoencefálica y alcanzar el parénquima cerebral. Este hallazgo pareció aclarar el origen de la insulina cerebral, aunque luego se detectó la expresión local de insulina en el SNC (**Madadi, Dalvi y Belsham 2008; van der Heide, Ramakers, y Smidt 2006**). Además, la clara existencia de receptores de insulina y de sus efectores en diversas estructuras cerebrales, incluso en las espinas dendríticas, sugirió una importante función neuronal de esta hormona.

Actualmente, se cree que la insulina además de regular la utilización de la glucosa, el principal combustible metabólico para el cerebro, posee un rol clave como neuromodulador de la función cerebral. Evidencias contundentes indicaron un potencial neurotrófico y neuroprotector de la insulina contra insultos tóxicos (**Brüning y col. 2000; Di Carlo y col. 2010**). Estudios recientes demostraron que la insulina puede inducir respuestas electrofisiológicas inmediatas (**Kovacs y Hajnal 2009**) y protección contra la muerte neuronal por apoptosis en la corteza y el cerebelo (**Tanaka y col. 1995; Ryu y col. 1999**). Así mismo, esta hormona también puede estimular la plasticidad sináptica y promover sinaptogénesis (**van der Heide, Ramakers y Smidt 2006; Chiu, Chen y Cline 2008**). Más aún, la señalización por insulina parece ser esencial para los procesos de formación y consolidación

de la memoria (**Zhao y col. 2004; McNay y col. 2010; McNay y Recknagel 2011**). Efectivamente, estudios recientes demuestran su capacidad para potenciar la función cognitiva en roedores y humanos saludables (**Dou y col. 2005; Haj-ali, Mohaddes y Babri 2009; Ott y col. 2012**).

Estudios del cerebro con EA realizados con tomografía por emisión de positrones demostraron una clara disminución de la utilización de glucosa que inicialmente comienza en el hipocampo y se correlaciona con el grado de deterioro cognitivo en diferentes etapas de la enfermedad (**Mosconi, Pupi, y De Leon 2008; Cunnane y col. 2011**). En el envejecimiento cerebral no patológico, sin embargo, se ha demostrado que el hipometabolismo de la glucosa es más leve (**Mosconi 2013; Loessner y col. 1995**). En el cerebro de ratas viejas, por ejemplo, se ha observado un metabolismo alterado de la glucosa, el cual está correlacionado con el deterioro del aprendizaje espacial (**Awasthi y col. 2011**). Estos cambios en el metabolismo de la glucosa en el cerebro envejecido pueden explicarse, al menos en parte, por una disminución de la actividad de enzimas glucolíticas clave y del número de transportadores de glucosa (**Camandola y Mattson 2017; Yin y col. 2016**). De manera interesante, los niveles cerebrales del factor de crecimiento símil insulina 1 (IGF-1), importante neuromodulador perteneciente a la familia de la insulina, también disminuyen con el envejecimiento (**Pardo y col. 2016**).

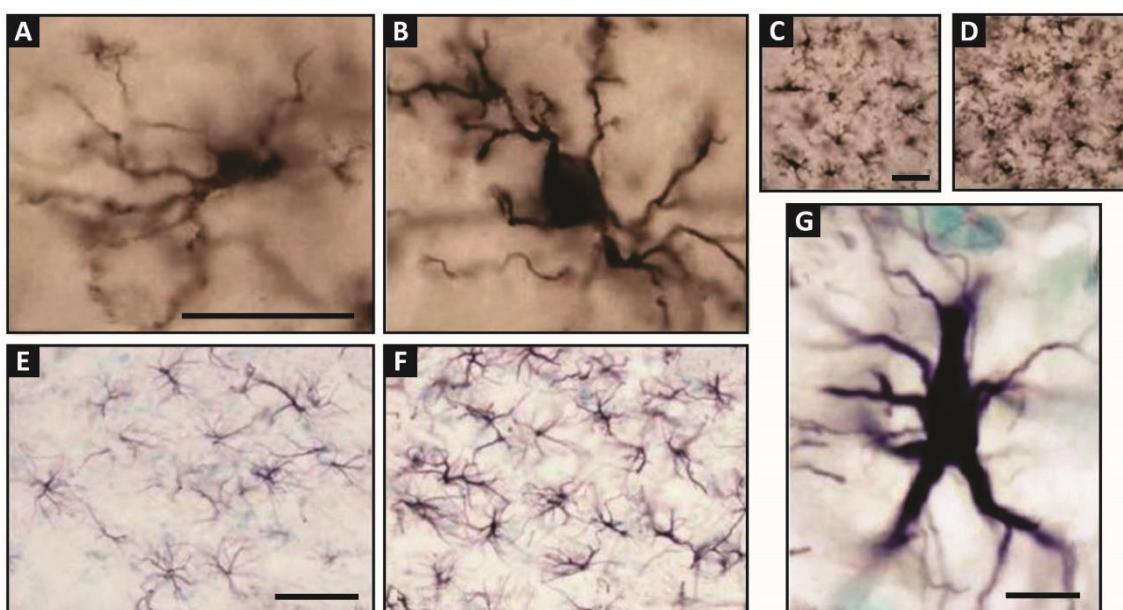
### **1.1.5 Neuroinflamación**

La inflamación es una reacción de defensa del organismo contra diversos estímulos nocivos. La respuesta inflamatoria induce efectos beneficiosos para el SNC, limitando la supervivencia y proliferación de patógenos invasores, además de promover la conservación y la reparación del tejido nervioso, mediante fagocitosis de detritos y células apoptóticas, por ejemplo. Sin embargo, un descontrol o altos niveles de estímulos inflamatorios resultan en la producción de factores neurotóxicos perjudiciales para el cerebro (**Khandelwal, Herman y Moussa 2011**).

La microglía y los astrocitos son las principales células responsables del inicio y exacerbación de la inflamación en el SNC. La microglía está formada por macrófagos especializados, las principales células que componen el sistema inmune del SNC (**Ransohoff y Perry 2009**). En condiciones fisiológicas, dichas células presentan largas ramificaciones con gran movilidad para monitorear el tejido y reconocer focos de daño o riesgo (**Nimmerjahn, Kirchhoff y Helmchen 2005**). En esta condición, la microglía está en un estado basal y promueve la inmunidad del tejido produciendo factores antiinflamatorios y neurotróficos (**Streit 2002**). Los astrocitos son las células más abundantes

del SNC y desempeñan muchas funciones, como el mantenimiento de la estructura y conservación de la barrera hematoencefálica y la nutrición y sustentación del tejido nervioso (**Moore y O'Banion 2002**).

En condiciones de estrés, ya sea por invasión de un patógeno, injuria o acumulación anormal de proteínas, las células gliales cambian su morfología hacia un fenotipo ameboide caracterizado por presencia de un cuerpo celular más esférico, hipertrofia nuclear, estiramiento de la célula y expresión/liberación de factores y proteínas (**Figura 2**). Este fenotipo más reactivo de las células gliales promueve una respuesta inflamatoria que estimula al sistema inmune a erradicar los estímulos de estrés (**Akiyama y col. 2000; Moore y O'Banion 2002; Khandelwal, Herman y Moussa 2011**).



**Figura 2: Células gliales normales y activadas.** Las imágenes A-D muestran inmunohistoquímica de células microgliales realizada contra la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1), las imágenes A y C son de células en su estado fisiológico, mientras que la B y D en el estado activado. Las imágenes de E-G muestran las células astrocitarias marcadas con proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), las cuales están activadas en F y con mayor aumento en G. Escala de las barras en: A-B 10  $\mu$ m; C-D 25  $\mu$ m, E-F 50  $\mu$ m, G 20  $\mu$ m. Adaptado de: (**Bland y col. 2010; Stozicka y col. 2010**)

Cabe mencionar que, durante la respuesta inflamatoria, las células microgliales pueden seguir diferentes vías de activación para realizar funciones distintivas: la vía de activación M1 conduce a lesión tisular que causa muerte e inflamación neuronal, mientras que el fenotipo M2 alternativo induce reparación y neuroprotección (**Cherry, Olschowka y O'Banion 2014; Sierra y col. 2007**).

Cuando la microglía se activa al fenotipo M1, se secretan citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL) 6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), especies reactivas del oxígeno (EROs) y marcadores de superficie como CD40, CD45, DC11b, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, etc (Kaur y col. 2015; Norden y Godbout 2013; von Bernhardi, Eugenín-von Bernhardi y Eugenín 2015).

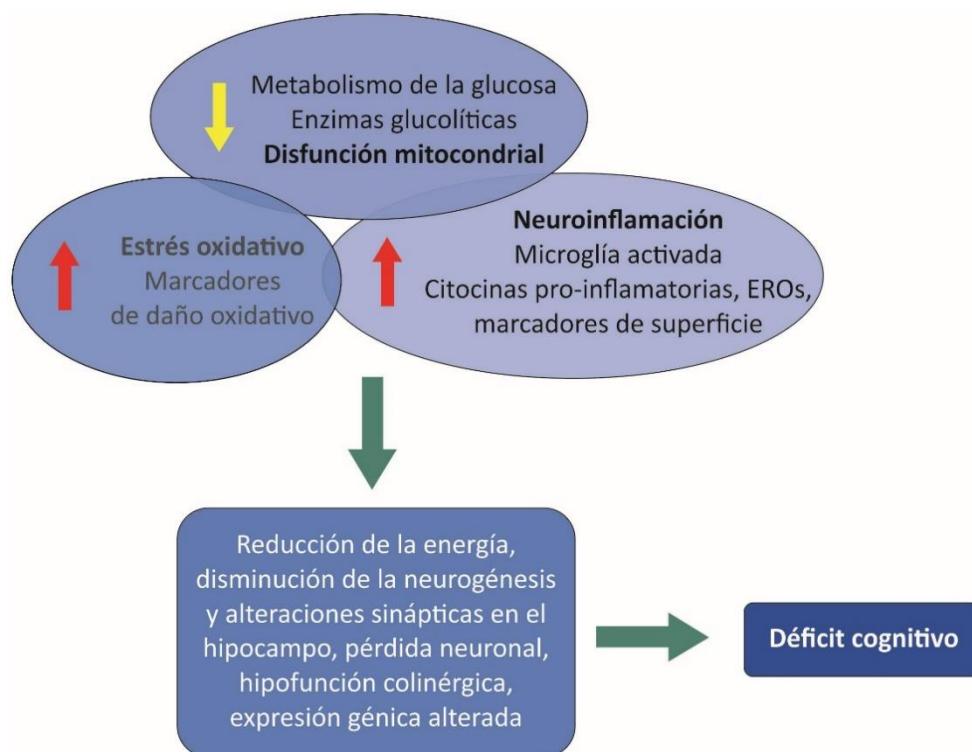
Las citoquinas proinflamatorias, cuyos receptores en el SNC tienen una amplia distribución, regulan en gran medida la plasticidad sináptica, la neurogénesis, el recambio de neurotransmisores y las funciones en diferentes regiones cerebrales que afectan la memoria, el aprendizaje, el estado de ánimo y el comportamiento (Sasanka Chakrabarti y col. 2015; Donzis y Tronson 2014). En el cerebro envejecido de animales experimentales se ha observado un estado de inflamación crónica tipificado por cambios microgliales hacia el estado de activación M1 con procesos más cortos y menos ramificados, junto con un aumento de secreción de las citoquinas proinflamatorias y una disminución de las citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (Sparkman y Johnson 2008).

Consecuentemente, el aumento de las citoquinas proinflamatorias en el cerebro que envejece podría explicar el deterioro del aprendizaje y la memoria en los animales de experimentación (Barrientos y col. 2010; Simen y col. 2011). La neuroinflamación en enfermedades neurodegenerativas como la EA, en contraste con el papel que juega en el envejecimiento cerebral normal, es clave para el desarrollo de la patología y se caracteriza por la activación microglial en el estado proinflamatorio (Sasanka Chakrabarti y col. 2015; Gomez-Nicola y Boche 2015).

Por otra parte, se sabe que el cerebro es altamente vulnerable al daño oxidativo mediado por una variedad de EROs que incluyen el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Chakrabarti y col. 2013; Halliwell 2006). Estos radicales libres altamente reactivos pueden causar daño celular a través de la peroxidación lipídica, formación de aductos de proteínas y ADN, entre otros (Poon y col. 2004). La acumulación de marcadores de daño oxidativo en el cerebro envejecido ha sido reportada en múltiples estudios en animales de experimentación, por lo que se ha propuesto que el estrés oxidativo contribuye al envejecimiento (Grimm y col. 2011; Perluigi y col. 2010). Específicamente, el aumento de estrés oxidativo en el cerebro que envejece provoca una defensa antioxidante alterada, disfunción mitocondrial y un estado cerebral proinflamatorio (Sasaki y col. 2008; Sasanka Chakrabarti y col. 2011; Grimm y Eckert 2017).

### 1.1.6 Comparación de la fisiopatología entre el envejecimiento cerebral no patológico y la Enfermedad de Alzheimer

En el cerebro con EA el hipometabolismo de la glucosa, la neuroinflamación, el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial, se manifiestan de manera más agravada que en el envejecimiento cerebral no patológico (**Figura 3**). Respecto a la perdida neuronal, muchos estudios indican cierta pérdida neuronal en diferentes regiones del cerebro envejecido (**Morterá y Herculano-Houzel 2012; Smith y col. 1999**). Por ejemplo, se ha observado que, en el envejecimiento, las neuronas colinérgicas sufren una moderada degeneración, resultando en una hipofunción colinérgica y ésta ha sido relacionada con las declinaciones cognitivas progresivas en la vejez (**Reinhard Schliebs y Arendt 2011**). En contraste, en el cerebro afectado por la EA se observa una extensa pérdida de neuronas y acumulación anormal de varias proteínas, las cuales son consideradas características patológicas distintivas de la enfermedad (**Freeman y col. 2008; Perl 2010; Serrano-Pozo y col. 2011**).



**Figura 3: Alteraciones moleculares y celulares que comparten el envejecimiento no patológico y la enfermedad de Alzheimer.**

## 1.2 Enfermedad de Alzheimer

### 1.2.1 Generalidades

La EA es la forma más común de demencia y contribuye al 60-70% de los casos (**World Alzheimer Report, 2018**). Se define a la demencia como un síndrome caracterizado por la alteración de múltiples funciones cerebrales, que incluyen la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio (**Dementia - OMS, 2018**).

En 1906, el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer, describió por primera vez las características clínicas y anatomico-patológicas de la EA. Sus hallazgos se basaron en el estudio de una paciente de 51 años, llamada Auguste Deter, que presentaba un cuadro grave de delirios, pérdida de memoria, desorientación y trastornos de la conducta y el lenguaje, quien finalmente falleció en estado de total invalidez tras cuatro años y medio de evolución clínica (**Hippius y Neundörfer 2003**).

Recientemente, se ha definido a la EA como un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible caracterizado por la pérdida insidiosa de memoria, de habilidades intelectuales y de razonamiento, así como por desorientación espacio-temporal, cambios de humor, alteraciones conductuales, afasia (disminución progresiva de la capacidad del lenguaje), apraxia (alteración de los gestos e incapacidad de realizar tareas rutinarias) y agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas o cosas) (**Reiman y Caselli 1999; van Strien, Cappaert y Witter 2009**). Estas alteraciones se deben a daños selectivos en regiones cerebrales implicadas en dichos procesos, tales como el hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala y el telencéfalo basal. El curso clínico de la EA suele durar unos 10 años y, normalmente, la muerte sobreviene por complicaciones secundarias a la enfermedad y al debilitamiento que conlleva, como neumonía, embolia pulmonar o sepsis (**Reiman y Caselli 1999**).

La ausencia de marcadores biológicos para la EA hace que el análisis neuropatológico *post mortem* sea crucial para el diagnóstico definitivo de la enfermedad. En la actualidad, aunque existen fármacos que mejoran los síntomas, no existe un tratamiento efectivo para prevenir o evitar su progresión.

### 1.2.2 Epidemiología y costos

Como se detalló previamente en la *sección 1.1*, el envejecimiento de la población se ha convertido en un fenómeno mundial. Por lo tanto, el número de personas afectadas con trastornos crónicos dependientes de la edad, tal como la EA, aumentó significativamente induciendo un impacto

dramático en la salud pública y el financiamiento de la atención médica (**Qiu, Kivipelto y von Strauss 2009**).

En 2015, cerca de 36 millones de personas en todo el mundo padecían EA (**Alzheimer's Association 2016**). Efectivamente, el incremento de dicha patología la ha convertido en el tercer problema de salud más grave en los países desarrollados, detrás de los accidentes cardiovasculares y el cáncer (**Ferri y col. 2005**).

En Argentina, se calcula que hay más de 500.000 personas afectadas con EA y que en 2050 serán más de un millón. A medida que la prevalencia de EA aumenta exponencialmente con la edad, se estima que una de cada ocho personas mayores de 65 años y casi la mitad de las personas mayores de 85 años padecen EA (**Prince y col. 2013**).

En la actualidad, el costo mundial directo de la atención de la EA se estima en U\$D 1 billón y se duplicará hacia el 2030, convirtiéndola en una de las enfermedades crónicas más costosas debido a la necesidad de cuidado constante (**World Alzheimer Report 2018 - The State of the Art of Dementia Research**). Por lo tanto, las consecuencias de la EA son invaluables, convirtiéndose en un desorden devastador, no solo por la pérdida de memoria sino también por la pérdida de la capacidad de mantener una vida independiente, lo que plantea serias responsabilidades familiares y sociales. A menos que se desarrollen terapias efectivas que retrasen la aparición o desvíen el curso de la enfermedad, el costo de la EA en la sociedad y en los sistemas de atención de la salud será insostenible.

### **1.2.3 Factores genéticos y de riesgo**

La EA se presenta en dos formas, la EA familiar (EAF), con herencia autosómica dominante y poca influencia del entorno, y la EA esporádica (EAE) que no está asociada a un patrón mendeliano de herencia. Estas dos formas son clínica y fenotípicamente muy similares a excepción de la edad de inicio, que es más temprana en pacientes que sufren de EAF.

#### **1.2.3.1 Enfermedad de Alzheimer familiar (EAF)**

Desde hace varias décadas se sabe que la EA puede heredarse de forma autosómica dominante, siendo la prevalencia de esta forma entre el 1 al 5% del total de casos (**Reitz y Mayeux 2014**). La EAF también se conoce como EA de inicio temprano ya que los síntomas afectan a personas menores de 60 años y presenta una tasa de progresión más rápida (**Rosenberg y col. 2000**).

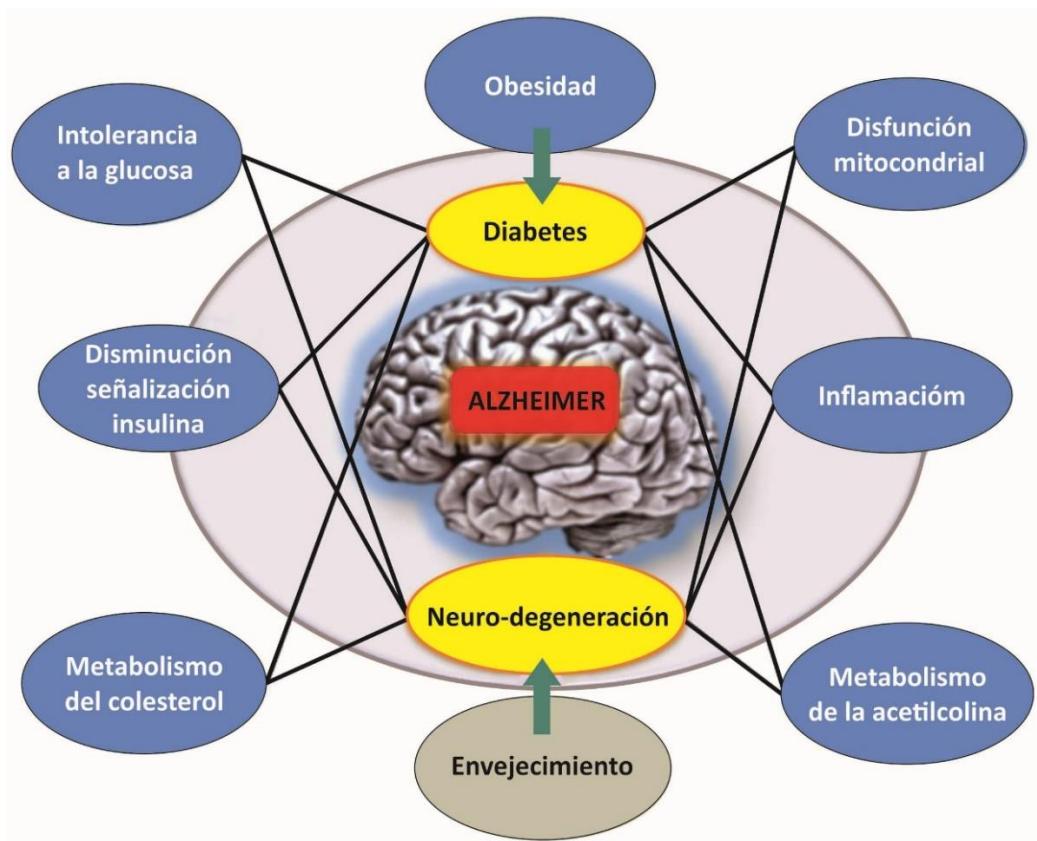
Como causas de EAF se han descrito hasta la fecha, más de 160 mutaciones altamente penetrantes, aunque raras, en tres genes que codifican a las siguientes proteínas: la proteína precursora de amiloide (PPA), en el cromosoma 21 (**Götz y Ittner 2008**); la presenilina (PSN) 1, en el cromosoma 14; y la PSN2, en el cromosoma 1 (**Scheuner y col. 1996**). Ambas PSNs son componentes esenciales de la  $\gamma$ -secretasa, enzima responsable del procesamiento aberrante del PPA para la producción de péptidos amiloideos. La PPA es una proteína integral de membrana con un gran dominio extracelular. La isoforma más expresada en neuronas es la APP695, que está presente en las sinapsis y parece ejercer una importante función en la regulación de la adhesión, migración y señalización neuronal (**Gralle y Ferreira 2007**). Mutaciones en estos tres genes conducen a la agregación de péptido beta amiloide ( $\beta$ A) y, por lo tanto, garantizan el inicio de la enfermedad (**Bagyinszky y col. 2014**).

#### 1.2.3.2 Enfermedad de Alzheimer esporádica (EAE)

La EAE es también conocida como EA de inicio tardío porque la edad de aparición es después de los 65 años; representa el 95% de todos los casos de EA y tiene un origen multifactorial con factores de riesgo genéticos y ambientales (**Ballard y col. 2011**).

Hasta la fecha, el único factor de riesgo genético demostrado en pacientes con EAE es el alelo  $\epsilon$ 4 del gen de la apolipoproteína E (Apo E4, cromosoma 19), fundamental para el metabolismo de triglicéridos y del colesterol (**Bagyinszky y col. 2014; Farrer y col. 1997**). Este alelo no es necesario ni suficiente para causar EA, pero opera como un factor de riesgo que disminuye la edad de inicio de la enfermedad de una manera dependiente de la dosis genética (**Corder y col. 1994**).

Si bien se sabe que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EAE (**Amaducci y Tesco 1994**), se ha observado que un desequilibrio en el metabolismo corporal a lo largo de la vida puede contribuir a su establecimiento (**Daviglus y col. 2011; Mattson 2012; De Felice 2013**). Entre otros factores de riesgo involucrados se pueden mencionar los antecedentes familiares (**Fratiglioni y col. 1993**), las lesiones cerebrales traumáticas (**Sivanandam y Thakur 2012**), las enfermedades cardiovasculares (**Pendlebury y Rothwell 2009**), la *Diabetes Mellitus* (DM) tipo II (**Rönnemaa y col. 2008; Kroner 2009**) y la dieta (**Scarmeas y col. 2009**). Por lo tanto, diferentes mecanismos parecen estar involucrados en la patogénesis de la EA (**Figura 4**).



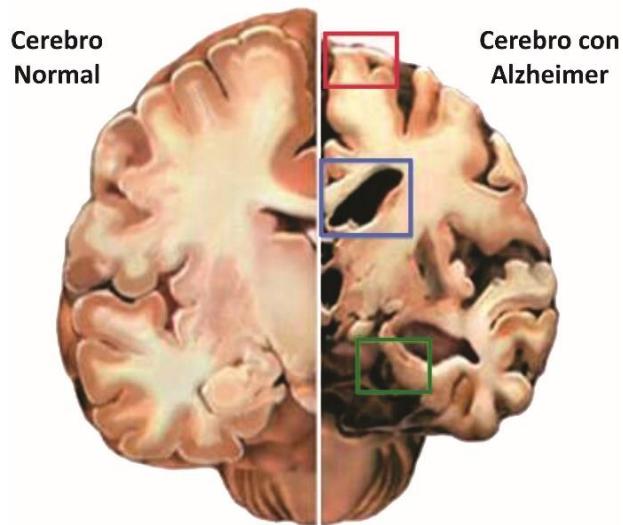
**Figura 4: Representación esquemática de los factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.**

#### 1.2.4 Patología

La principal característica de la etiología de la EA es que su progresión global no se limita a la disfunción de un solo mecanismo. Los síntomas son el resultado de una multiplicidad de estímulos patológicos.

Los principales cambios macroscópicos característicos del cerebro incluyen una importante atrofia cortical, con adelgazamiento de las circunvoluciones, ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges y dilatación de las cavidades ventriculares (**Figura 5**) (Castellani, Rolston, y Smith 2010; Walsh y Selkoe 2004). Las primeras estructuras afectadas son el hipocampo, la corteza entorrinal y el neocortex, siendo dañadas posteriormente áreas corticales motoras y sensoriales (Petersen y col. 2006). Dado que el hipocampo desempeña un papel crucial en el procesamiento de la memoria y es una de las primeras y principales regiones afectadas en la EA, elegimos esta región como foco principal de estudio. Precisamente, se ha evidenciado que el *Stratum Radiatum* (SR) y el

giro dentado (GD) son dos zonas hipocampales particularmente vulnerables a la degeneración en pacientes con la EA (**West 1993; Hyman y col. 1984**).



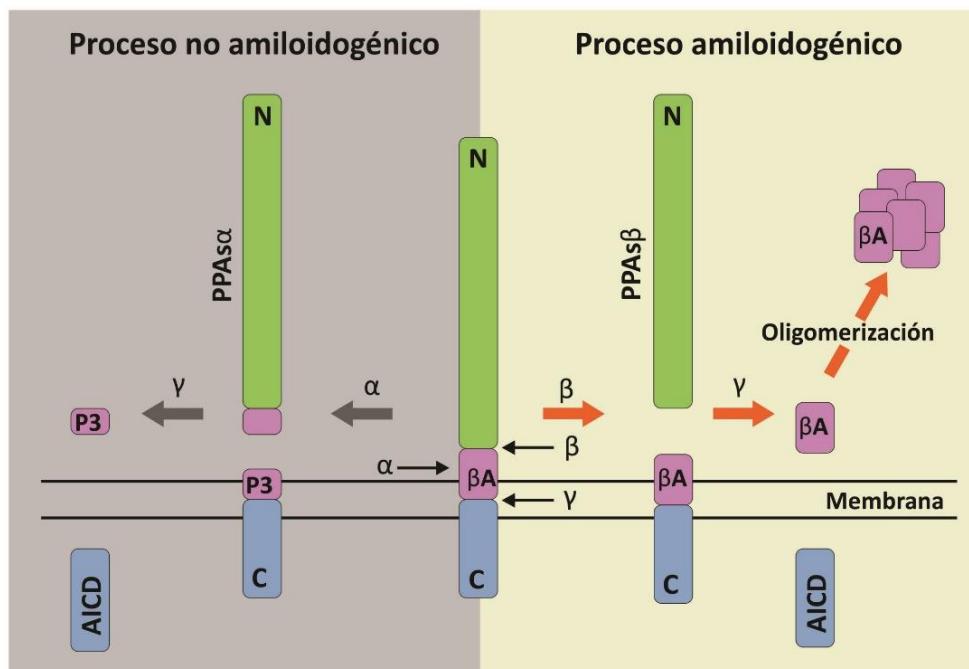
**Figura 5. Esquema comparativo de un cerebro humano sano (izquierda) y otro de un paciente con EA (derecha).** Se aprecia como el cerebro con Alzheimer posee un menor volumen, un adelgazamiento severo de la corteza (resaltado en rojo), una dilatación ventricular pronunciada (resaltado en azul) y una reducción significativa del hipocampo (resaltado en verde).

Microscópicamente, las principales características neuropatológicas de la enfermedad consisten en depósitos anormales de proteínas (**Goedert y Spillantini 2006**), que conforman ovillos neurofibrilares (ONF) de la proteína Tau agregada y placas seniles (PS) del péptido  $\beta$ A (**Gomez-Isla y col. 2008; Perl 2010; Serrano-Pozo y col. 2011**). Los ONF y las PS, descritos por el Dr. Alois Alzheimer hace más de 100 años, constituyen, aún en la actualidad, las estructuras histopatológicas *post mortem* para el diagnóstico definitivo de la enfermedad (**Duyckaerts, Delatour y Potier 2009; Ferreira y Klein 2011**).

A diferencia de las PS, que se localizan en el espacio extracelular, los ONF se observan dentro de la neurona y son el resultado de la hiperfosforilación de la proteína Tau, una proteína cuya principal función bioquímica es la estabilización de los microtúbulos (**Takashima 2010; Ittner y col. 2010**).

El péptido  $\beta$ A es generado a partir del clivaje proteolítico de la proteólisis de la PPA. Dicha proteólisis se obtiene por la acción secuencial de un grupo de enzimas llamadas secretasas, que pueden actuar por dos vías distintas. La primera de ellas es la vía no amiloidogénica, en la cual la  $\alpha$ - y  $\gamma$ -secretasa clivan secuencialmente la PPA formando fragmentos solubles que no tienen participación en la

patofisiología de la EA. Sin embargo, la PPA puede sufrir acción de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa y generar los fragmentos amiloidogénicos  $\beta$ A (más comúnmente el  $\beta$ A1-40 y el  $\beta$ A1-42) (Figura 6) y éstos, a su vez, desencadenan varias cascadas patológicas que llevan a disfunciones sinápticas y dendríticas, además de activar la microglía y los astrocitos e inducir muerte celular (Moore y O'Banion 2002; Cummings 2004; Selkoe 2005).



**Figura 6. Representación esquemática del procesamiento de la proteína precursora amiloide (PPA).**  
 Procesamiento no amiloidogénico (izquierda): La  $\alpha$ -secretasa proteoliza a APP liberando un fragmento soluble al espacio extracelular llamado  $\alpha$ -APP. A continuación, la  $\gamma$ -secretasa corta el fragmento que queda en la membrana liberando un fragmento citoplasmático (AICD) y otro extracelular (p3). Procesamiento amiloidogénico (derecha): La  $\beta$ -secretasa (BACE1) corta a APP liberando el fragmento extracelular  $\beta$ -APP (soluble), más corto que en el proceso no amiloidogénico. El extremo C-terminal es proteolizado ahora por el complejo  $\gamma$ -secretasa generando el péptido A $\beta$  y un fragmento citoplasmático (AICD) idéntico al del otro proceso. La acumulación del péptido A $\beta$ , de solubilidad limitada, formará autoagregados, que constituyen las fibrillas de las placas seniles. Adaptado de: (Nicolas y Hassan 2014).

La serie de eventos recién mencionados constituye *la hipótesis de la cascada amiloide*, que postula que el evento patogénico inicial que desencadena la EA sería un aumento en los niveles de A $\beta$  en el

cerebro del paciente, y que éste da comienzo a una cascada de señalización tóxica que finalmente lleva a la muerte neuronal, lo cual se evidencia en un estado de demencia en las personas.

Sin embargo, la existencia de deposición de placas amiloïdes en individuos sin demencia (**Mochizuki y col. 1996**) y la falta de correlación entre la intensidad de deposición de las placas y la severidad de la disfunción cognitiva (**Richardson y col. 2003**) comprometieron las predicciones de esta hipótesis. Con las contribuciones de éstos y otros estudios que sucedieron a la propuesta inicial de la cascada amiloïde, una nueva versión fue elaborada por Hardy y Selkoe (**Hardy y Selkoe 2002**). Esta hipótesis revisada presenta algunas modificaciones importantes, como la inclusión del impacto neurotóxico del péptido  $\beta$ A, especialmente en su forma oligomérica. Estudios recientes han demostrado que dichas formas oligoméricas solubles (oligómeros derivados de  $\beta$ A, O $\beta$ As) también son capaces de inducir toxicidad y alterar la transducción de señales en las sinapsis, de forma más rápida y con un grado de toxicidad semejante al de las PS (**Krafft y Klein 2010**). Los O $\beta$ As reducen la plasticidad sináptica, potencian la pérdida de sinapsis, alteran el metabolismo de la glucosa, contribuyen a los daños oxidativos e inducen la hiperfosforilación de Tau (**Kroner 2009**).

Por otra parte, existe una pérdida significativa de neuronas y contactos sinápticos en áreas cerebrales selectivamente vulnerables (**Gómez-Isla y col. 1996**) que, en muchas ocasiones, están implicadas en el procesamiento de la información y la adquisición de la memoria, como por ejemplo las neuronas de la región CA1 del hipocampo (**West y col. 1994**). De manera concomitante, se desencadena una depleción de neurotransmisores (**Monczor 2005**) y de factores neurotróficos como el IGF-1 (**Bondy y Lee 1993**), que contribuye a la disfunción sináptica. También, como se detalla a continuación, es característica la presencia de un proceso neuroinflamatorio con activación glial (**Heneka y col. 2015**), defectos mitocondriales y daño oxidativo, déficit del metabolismo energético y neurodegeneración (**Hardy y Selkoe 2002; Praticò 2008; Stix 2010**).

#### **1.2.4.1 Señalización colinérgica**

En la EA, evidencias demuestran una correlación positiva entre la intensidad de los síntomas clínicos de demencia y la reducción de los marcadores corticales de actividad colinérgica (**Bartus 2000; Gsell, Jungkunz, y Riederer 2004**), por lo cual se ha propuesto a la alteración de la vía colinérgica como una hipótesis del inicio de la enfermedad. En condiciones normales, el neurotransmisor acetilcolina (ACh) es sintetizado a partir de la colina y la coenzima A (CoA) por la acción de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) principalmente en las neuronas colinérgicas de los núcleos de la base de

Meynert que se proyectan hacia la corteza e hipocampo. Después de su formación, la ACh es liberada en la grieta sináptica donde podrá ser acoplada a dos tipos de receptores, los muscarínicos y nicotínicos. Finalmente, la ACh es degradada en la hendidura sináptica por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en colina y acetato (**Schliebs y Arendt 2011**). Evidencias experimentales y clínicas, muestran que la ACh es uno de los neurotransmisores más importantes involucrados en la regulación de las funciones cognitivas (**Schliebs y Arendt 2006; Agrawal y col. 2010; Ishrat y col. 2009**). Dado que en la EA los niveles de Ach y ChAt se encuentran disminuidos, se han empleado inhibidores de la AChE para reducir la hidrólisis de la ACh y de esta manera ralentizar el avance de los síntomas cognitivos de la EA (**Francis y col. 1999**). Sin embargo, debido a que los tratamientos colinérgicos para la EA solo han logrado efectos modestos sin detener la progresión de la enfermedad, la hipótesis colinérgica ha perdido solidez (**Dumas y Newhouse 2011**).

#### **1.2.4.2 Señalización de la insulina y metabolismo energético cerebral**

La vía de señalización de la insulina es una vía metabólica altamente dominante y conservada en el control de la homeostasis energética y de nutrientes (**Hotamisligil, Shargill y Spiegelman 1993**).

La propuesta de que la señalización de la insulina contribuiría a la patogénesis de la EA es una hipótesis relativamente reciente. Evidencias crecientes soportan el concepto de que la EA representa fundamentalmente una enfermedad metabólica en la que la utilización de la glucosa por el cerebro y la producción de energía se encuentran afectadas (**Bingham y col. 2002; Hoyer 2002; de la Monte 2012**).

Las anormalidades metabólicas cerebrales han sido asociadas a la resistencia a la insulina y al IGF-1, las cuales inducirían la interrupción de las vías de señalización que regulan la supervivencia neuronal, la producción de energía, la expresión génica y la plasticidad sináptica (**Frölich y col. 1998; Plum, Schubert y Brüning 2005; Kroner 2009**).

El transporte de glucosa a las células neuronales es independiente de la insulina, por lo que la función de la insulina en el cerebro no está totalmente comprendida. Además, la escasa correlación entre la localización de los receptores de insulina (RI) y la utilización de la energía por parte de las neuronas sugieren un rol fisiológico diferente de la insulina en el SNC. Efectivamente, diversos estudios le otorgan a la insulina un rol neuromodulador sobre procesos de liberación de neurotransmisores en las sinapsis y en la activación de vías de señalización asociadas con el aprendizaje y la memoria (**Brüning y col. 2000; Plum, Schubert y Brüning 2005; Benedict y col. 2011**).

Consecuentemente, se ha sugerido que la cascada de señalización desencadenada por la insulina / RI estaría asociada a la homeostasis del metabolismo energético y a la aparición y progresión de desórdenes neurodegenerativos (**Plum, Schubert y Brüning 2005; Halmos y Suba 2011; Benedict y col. 2004**). Por tanto, la inhibición de esta vía de señalización en la EA contribuye a la neurodegeneración por aumentar: i) la actividad de quinasas que fosforilan anormalmente a Tau; ii) la expresión de la PPA y la acumulación del péptido  $\beta$ A; iii) la disfunción mitocondrial; iv) el estrés oxidativo (por el aumento de la producción de EROs llevando a daños en las proteínas, ARN, ADN y lípidos); v) la activación de factores pro-inflamatorios y pro-apoptóticos; y, finalmente, vi) la desregulación del sistema colinérgico, alterando la plasticidad neuronal, memoria y cognición (**Frölich y col. 1998; Benedict y col. 2011; Cholerton, Baker y Craft 2011; Halmos y Suba 2011; de la Monte 2012**).

#### 1.2.4.3 Daño oxidativo y Neuroinflamación

Otra hipótesis que intenta explicar la patogénesis de la EA es la de los radicales libres. Durante los procesos neurodegenerativos se produce una descompensación entre la producción de los radicales libres y la defensa antioxidante celular, que conduce a fallos en diferentes funciones biológicas, oxidación de lípidos, proteínas y ADN y, finalmente, a la muerte celular.

Al mismo tiempo, se han reportado evidencias que demuestran que la neuroinflamación contribuye en la progresión de la EA y, dado que las células gliales se encuentran activadas en las regiones que circundan a las PS, se cree que el péptido  $\beta$ A debe inducir un proceso inflamatorio (**Akiyama y col. 2000; Castro y col. 2002; Glass y col. 2010**). La activación glial ocasiona daño a las neuronas a través de la producción de mediadores inflamatorios, tales como óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) (**Moore y O'Banion 2002; Khandelwal, Herman y Moussa 2011**). GFAP e Iba-1 son marcadores de activación astrocitaria y microglial (**Figura 2**), respectivamente, y sus producciones excesivas están altamente asociadas con la generación de un cuadro neuroinflamatorio y neurodegenerativo, como se mencionó en la **sección 1.1.5**.

Por último, cabe mencionar que se ha identificado una conexión entre la neuroinflamación y la desregulación metabólica. En particular, en la modulación de la vía de señalización de la insulina, que es considerada la más relevante por las funciones previamente mencionadas (**sección 1.2.4.2**). Así, además de las citoquinas, otros factores, como por ejemplo el exceso de lípidos circulantes, activan

señales inflamatorias que directamente inhiben la señalización del RI. En paralelo, las vías pro-inflamatorias también son inducidas por estrés de organelas debido a la sobrecarga de nutrientes, resultando en un procesamiento anormal que culmina con el estrés metabólico celular (**Hotamisligil 2006**).

### 1.3 Modelos animales

#### 1.3.1 Rata senil

En nuestro laboratorio, contamos con la rata hembra senil de la cepa *Sprague Dawley* (SD) como modelo de envejecimiento. Estos animales viven típicamente hasta los 34-36 meses de edad y su vida reproductiva cesa a los 9-10 meses (**Rodríguez y col. 2013**). El principal problema de salud que tienen dichas ratas al envejecer es el desarrollo de prolactinomas hipofisarios, lo cual conlleva a niveles séricos elevados de prolactina y, en consecuencia, a la aparición de tumores mamarios (**Hereñú y col. 2007**).

Las ratas hembras SD han sido ampliamente utilizadas en estudios sobre envejecimiento cerebral, observándose que el deterioro de la memoria espacial comienza a los 14 meses, con mayor deterioro a los 20-26 meses (**Barrett y col. 2009**). Además, se observó en ratas viejas una disminución en la densidad sináptica en la región del SR (**Li y col. 2009**), estructura hipocampal sumamente relevante en los procesos cognitivos.

De manera interesante, sabemos que la reactividad inmune y los procesos inflamatorios aumentan con el envejecimiento cerebral (**Lucin y Wyss-Coray 2009**), siendo la microglía protagonista en esta desregulación inmunitaria, como efecto inmune de inflamación y de reconocimiento de antígenos en el cerebro (**Streit y col. 2004; Luo, Ding y Chen 2010; Norden y Godbout 2013**). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que en las ratas hembras envejecidas existe un aumento significativo de la microglía reactiva y, además, se han identificado una serie de genes inmunes hipocampales que están alterados en los animales envejecidos (**Pardo y col. 2017**).

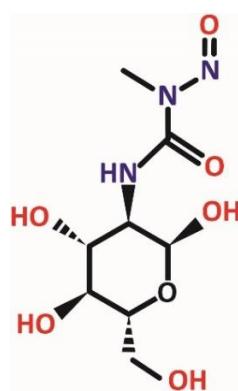
#### 1.3.2 Modelo animal de la enfermedad de Alzheimer esporádica: STZ-icv

Los modelos animales que mimetizan la patología de la EA son herramientas sumamente importantes en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.

Como se mencionó anteriormente, una disminución del metabolismo energético en el SNC ha sido

descripta en la EA, proponiéndola como una de las características más precoces (**Hoyer 1998**). Diversos estudios han encontrado anormalidades en el metabolismo cerebral de la glucosa y en la señalización mediada por el RI neuronal en la EAE, las cuales preceden al deterioro de las funciones cognitivas (**Frölich y col. 1998; Hoyer 2002, 2004**). Por consiguiente, se hipotetizó que la EAE funcionaría como una DM insulino-independiente (tipo II) cerebral (**Hoyer 1998; Salkovic-Petrisic y col. 2006**).

En base a estos conocimientos, fue desarrollado un modelo experimental en roedores usando estreptozotocina (STZ) para inducir disfunción del sistema insulínico cerebral. La STZ (una glucosamina derivada de nitrosurea) (**Figura 7**), es una droga de estructura similar a la glucosa, lo cual facilita su acceso a las células a través del transportador de glucosa de tipo 2 (GLUT2) (**Santos y col. 2012**). Cuando es administrada por vía iv o intraperitoneal (ip) en animales de experimentación, la STZ presenta toxicidad selectiva para las células  $\beta$  pancreáticas debido a la elevada expresión de GLUT2 e induce DM insulino-dependiente (tipo I) o DM tipo II en función de las dosis (**Szkudelski 2001**). La inyección intracerebroventricular (icv) de STZ a bajas dosis (subdiabetogénicas), en cambio, no altera los niveles plasmáticos de glucosa y no induce DM, pero altera el metabolismo cerebral de la glucosa (**Hellweg y col. 1992; Salkovic-Petrisic y col. 2006**). Considerando la importancia de la insulina en el cerebro, y que la deficiencia en la señalización de esta hormona está relacionada tanto con la DM como con la EA, la inyección icv de STZ es considerada por muchos autores como un modelo de la EAE (modelo STZ-icv) (**Biessels y col. 2005; Henneberg y Hoyer 1995; Hoyer 2004; Salkovic-Petrisic y col. 2006**).



**Figura 7: Estructura química de la estreptozotocina (STZ)**

A nivel periférico, la STZ induce muerte celular por alquilación de ADN y activación de la poli-ADP-ribosilación. Precisamente, la STZ es un donante de óxido nítrico, compuesto que participa en el efecto citotóxico de la STZ y contribuye, junto con la generación de EROs, a la fragmentación del ADN

y al desarrollo de otras acciones deletéreas en las células (**Lenzen 2008; Szkudelski 2001**). Además, la acción de la STZ en la mitocondria resulta en la formación de superóxido, inhibición del ciclo del ácido tricarboxílico y disminución sustancial del consumo de oxígeno por la mitocondria, limitando fuertemente la producción de ATP mitocondrial (**Szkudelski 2001**). Sin embargo, el mecanismo de acción de la droga en el SNC aún no ha sido elucidado.

Ciertamente, los hallazgos moleculares y conductuales que proceden a la perturbación del metabolismo de la glucosa y la señalización de la insulina luego de la administración icv de STZ en animales, parecen mimetizar, al menos en algunos aspectos, a la EA. El modelo en rata se caracteriza por un progresivo déficit de la memoria acoplado a diversos efectos citotóxicos, tales como trastornos en la utilización de la glucosa y, consecuentemente, del metabolismo energético, alteraciones en el sistema colinérgico, estrés oxidativo y neurodegeneración (**Lester-Coll y col. 2006; Hoyer y Lannert 2008; Plaschke y col. 2010; Salkovic-Petrisic y col. 2011; Deshmukh y col. 2016; Ishrat y col. 2009; Agrawal y col. 2010; Kumar, Jaggi y Singh 2010**). Estas alteraciones ocurren algunas semanas después de la inyección y perduran por períodos indeterminados.

Específicamente, se ha observado que la inyección icv de STZ induce, además de la muerte celular (**Lester-Coll y col. 2006; Javed y col. 2011**), un aumento de la fosforilación de la proteína Tau en diversas regiones en el cerebro de rata (**Grünblatt y col. 2007; Plaschke y col. 2010; Santos y col. 2012**), aumenta la expresión del péptido  $\beta$ A (**Chu y Qian 2005; Lester-Coll y col. 2006; de la Monte y col. 2006; Salkovic-Petrisic y Hoyer 2007; Santos y col. 2012**) e incluso se ha descripto la formación de PS (**Knezovic y col. 2015; Paidi y col. 2015; Smriti Gupta y col. 2018**). Las células gliales también son activadas por la STZ, indicando la presencia de neuroinflamación en este modelo (**Prickaerts, Fahrig y Blokland 1999; Weinstock y Shoham 2004; Rodrigues y col. 2010**). Conjuntamente, se ha descripto un aumento de la expresión de GFAP hipocampal, lo que sugiere que la función de esta región está afectada por la STZ (**Santos y col. 2012; Shoham y col. 2007**).

Datos recientes han sido consistentes en mostrar, luego de la administración icv de STZ, déficits cognitivos, de aprendizaje y memoria, a corto y largo plazo, en el MWM (**Hoyer y Lannert 2008; Santos y col. 2012; Shoham y col. 2007**). Así mismo, algunos estudios demuestran que dosis inferiores de STZ resultan en un déficit cognitivo menor (**Grünblatt y col. 2006; Prickaerts y col. 2000**). La inyección icv de STZ también altera otros patrones de comportamiento, como la ansiedad (evaluada mediante el laberinto en cruz elevado) y la memoria de reconocimiento (evaluada en el test de reconocimiento del objeto nuevo, NOR) (**Ishrat y col. 2009; Veerendra Kumar y Gupta 2003**).

Respecto de la insulina y el metabolismo de la glucosa Duelli (**Duelli y col. 1994**) mostró que, después de la inyección icv de STZ, hay una alteración severa en la utilización de glucosa y disminución del metabolismo energético en 17 regiones cerebrales. Además, se demostró que la inyección icv de STZ reduce drásticamente la actividad de enzimas de la vía glucolítica y posiblemente desensibiliza los receptores cerebrales de insulina (**Plaschke y col. 2010**). Diversos autores demostraron que la STZ también disminuye la expresión y la densidad de los RI y la síntesis cerebral de insulina (**Grünblatt y col. 2007; Agrawal y col. 2011**).

La reducción del metabolismo energético neuronal causado por la STZ, junto con la disfunción colinérgica (disminución en la actividad de ChAT y aumento de la actividad de AChE) pueden constituir la base biológica para la reducción en la habilidad de aprendizaje y memoria (**Blokland y Jolles 1993; Hellweg y col. 1992; Weinstock y Shoham 2004; Lester-Coll y col. 2006; Sharma, Singh y Singh 2008; Ishrat y col. 2009; Henneberg y Hoyer 1995**). En la **Figura 8** se esquematiza el mecanismo probable por el cual la STZ induce citotoxicidad y déficit cognitivo.

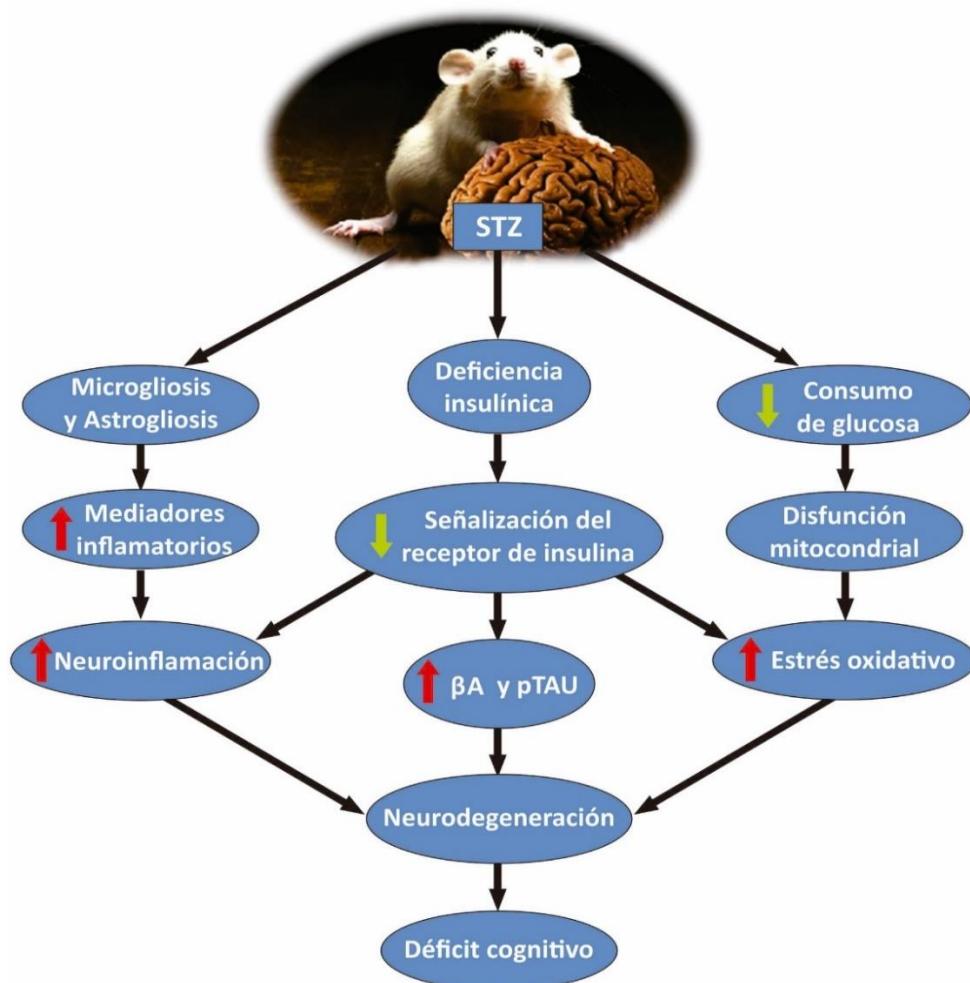


Figura 8: Mecanismo de acción propuesto para la toxicidad inducida por la STZ-icv.

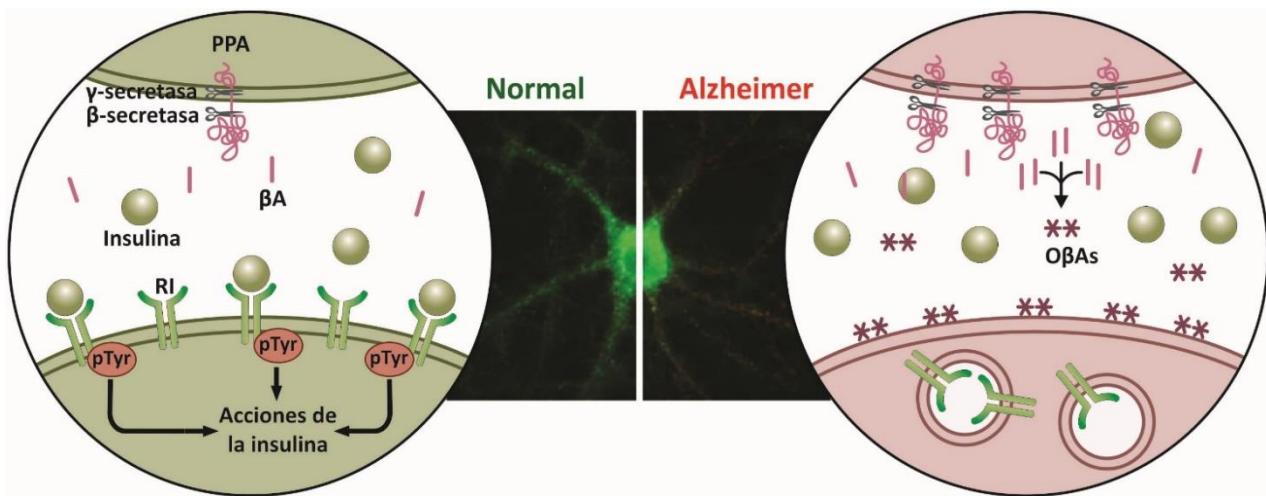
Inicialmente se pensó que la administración central de STZ tendría sus efectos restringidos a neuronas y glia que expresan GLUT2, dado que este trasportador es necesario por vía periférica (**Kamat 2015**). Sin embargo, la utilización de inhibidores de GLUT2 asociados a la administración icv de STZ no fue capaz de suprimir el déficit de memoria causado por la droga en ratas (**Grünblatt y col. 2007**). Esto sugiere que la STZ tiene acciones independientes del GLUT2, pudiendo alcanzar el medio intracelular a través de otros transportadores e induciendo efectos tóxicos generalizados.

### **1.3.3 Modelos experimentales generados por oligómeros de $\beta$ A**

Desde la década del 90, dado las crecientes evidencias de que los oligómeros solubles del péptido  $\beta$ A son neurotóxicos incluso en ausencia de los depósitos amiloides, se iniciaron numerosos trabajos para su estudio (**Mucke y Selkoe 2012**). En efecto, se han identificado concentraciones significativamente más altas de oligómeros  $\beta$ A en extractos de cerebros con EA, comparados con individuos controles sin demencia, y se ha observado que las características fisicoquímicas de estos oligómeros endógenos son muy similares a los sintetizados en laboratorio (**Gong y col. 2003; De Felice y col. 2008**).

Además, evidencia considerable indica que los O $\beta$ As están implicados en la disfunción sináptica temprana y en el deterioro de la memoria en la EA. En modelos experimentales *in vitro*, luego de períodos prolongados de incubación de neuronas con los oligómeros, se observa una dramática reducción del número de espinas dendríticas neuronales (**Hsieh y col. 2006; Lacor y col. 2007; De Felice y col. 2009**). Como las espinas son protrusiones especializadas de las dendritas en las cuales ocurren las sinapsis excitatorias, el impacto de los oligómeros en las sinapsis sugiere la base para la pérdida de la conectividad neuronal y consecuentemente para el déficit cognitivo observado en los pacientes con la EA. Estos efectos deletéreos sobre las sinapsis son probablemente resultado de la capacidad de los oligómeros para ligarse con gran especificidad a sitios sinápticos excitatorios (**Lacor y col. 2007**), evento de particular relevancia para el mecanismo de la pérdida de memoria.

Se han investigado los mecanismos utilizados por los oligómeros para dañar la plasticidad sináptica. Brevemente, se ha observado que la exposición de las neuronas a los O $\beta$ As induce la internalización de los RI dendríticos (**Figura 9**), reduciendo de forma significativa su expresión en la membrana plasmática, y la inhibición del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), induciendo resistencia a insulina neuronal (**De Felice y col. 2009; Zhao y col. 2008; Kroner 2009**).



**Figura 9: Los oligómeros de  $\beta$ A remueven los RI de la superficie de la membrana neuronal.** Superposición de imágenes de inmunofluorescencia de una neurona control (izquierda) y una neurona expuesta a los oligómeros  $\beta$ A (derecha). Imagen izquierda: neurona sana en ausencia de  $\beta$ A (sin marcación oligómeros  $\beta$ A positiva observado en rojo), presenta una abundante marcación dendrítica de RI (puntos verdes). En el círculo a la izquierda se representa un esquema de un segmento dendrítico; se producen niveles fisiológicos de  $\beta$ A, pero no su acumulación. La presencia de RI en la membrana permite la señalización por insulina. Imagen derecha: los oligómeros  $\beta$ A se une a las neuronas (puntos rojos) causando la remoción de los RI de la superficie de la membrana (puntos verdes). En el círculo a la derecha se representa un esquema de un segmento dendrítico; los oligómeros  $\beta$ A se acumulan debido al alto nivel de  $\beta$ A generado por el clivaje de la PPA. Adaptado de: (De Felice 2013).

Es importante resaltar que la pérdida patológica de las espinas y sus moléculas asociadas, así como la acumulación de niveles sustanciales de oligómeros de  $\beta$ A, están bien descriptas en pacientes con EA (Scheff y Price 2003; Gong y col. 2003; Lacor y col. 2004) y en modelos de animales transgénicos para EA (Calon y col. 2004; Moolman y col. 2004; Spires y col. 2005; Jacobsen y col. 2006).

Los eventos adicionales causados por los oligómeros, que también interfieren con procesos sinápticos importantes, incluyen la fosforilación aberrante de Tau en residuos que característicamente están hiperfosforilados en cerebros de pacientes con EA (Zhao y col. 2008) y, además, el estrés oxidativo.

El conjunto de estos hallazgos sugiere que las sinapsis son el principal blanco de los oligómeros, y que la interacción oligómeros-sinapsis provoca cambios morfológicos y en la composición de receptores

que finalmente resultan en la disfunción sináptica, la cual es probablemente responsable del déficit cognitivo inicial que ocurre en individuos con EA (**Klein 2006; Ferreira y Klein 2011**).

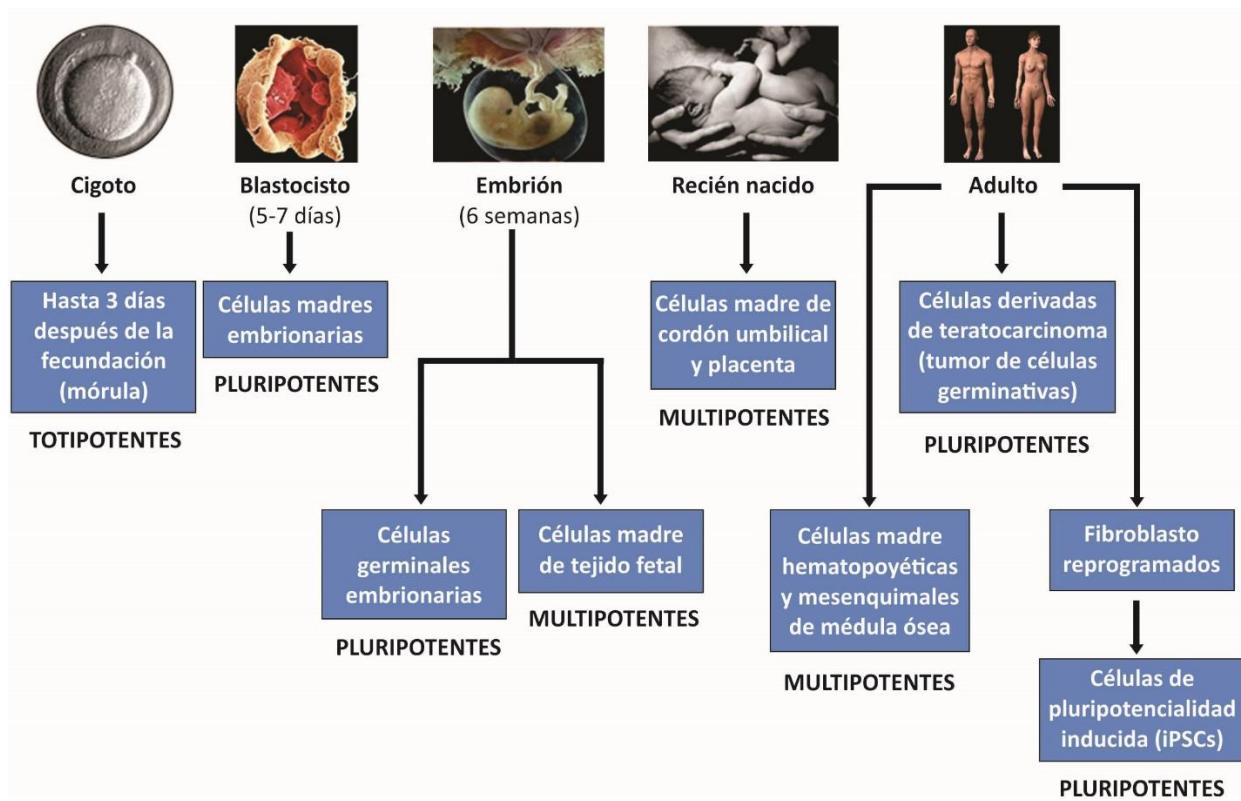
En síntesis, estos datos refuerzan y validan la relevancia clínica del uso de los oligómeros del péptido  $\beta$ A como modelo experimental para la EA.

## 1.4 Estrategias terapéuticas

### 1.4.1 Células madre: conceptos generales

Considerando la amplia gama de enfermedades para las que la medicina actual todavía no ofrece un tratamiento definitivo, las células madre surgen como un campo promisorio dentro de la medicina regenerativa (**Ringe y col. 2002; Martínez-Morales y col. 2013**). En este sentido, diversas estrategias están siendo utilizadas con el fin de reparar tejidos y órganos dañados. Una de ellas se basa en el trasplante de células madre liberadas localmente (por ejemplo, por trasplante intracerebral) o sistémicamente (por vía intravenosa) y puede implicar el uso de células del propio paciente (trasplante autólogo) o de un individuo diferente (trasplante alogénico).

Las células madre son células indiferenciadas capaces de autorrenovarse y que dan origen a más de un tipo celular, siendo clasificadas como totipotentes, pluripotentes o multipotentes de acuerdo con su potencial de diferenciación (**Figura 10**). Así, las células madre totipotentes (es decir, capaces de originar un organismo completo) corresponden al cigoto y a las células resultantes de sus divisiones celulares iniciales (hasta la etapa de mórula). Las células pluripotentes (capaces de originar células de los tres folículos germinativos, con excepción de los anexos embrionarios) incluyen las células madre embrionarias, las células germinales embrionarias, células de carcinoma embrionario, así como las células de pluripotencialidad inducida (iPSCs). Por otro lado, las células madre fetales, de los recién nacidos (como las células madre del cordón umbilical) y del adulto (como las células madre de la médula ósea y las células madre neurales) son consideradas multipotentes, pues en general sólo dan origen a las células del tejido del que se obtuvieron (**The National Institutes of Health - 2018**).



**Figura 10. Diferentes tipos de células madre encontradas a lo largo de la vida del individuo.** De acuerdo con la etapa del desarrollo del organismo, las células madre presentan variaciones en su potencial de diferenciación, que en general decrece con la edad: así, el cigoto y las células de la mórula son células madre totipotentes; las células madre embrionarias, las células germinales embrionarias y de carcinoma embrionario son células madre pluripotentes; las células madre fetales, de cordón umbilical y adultas son células madre multipotentes. Las células iPSCs se obtienen a partir de la reprogramación genética de células somáticas, presentando características de células madre embrionarias, por la superexpresión de genes de pluripotencialidad. Adaptado de: (The National Institutes of Health, 2018).

Se sabe que el nicho o microambiente en el que las células madre se encuentran contribuye a la proliferación, la migración y la diferenciación de las mismas, debido a la presencia de factores solubles (como factores de crecimiento y quimiocinas) e interacciones célula-célula (Walker, Patel y Stappenbeck 2009; Florian y Geiger 2010; Barkho y Zhao 2011; Kshitiz y col. 2012; Ang y col. 2014).

#### 1.4.1.1 Aplicaciones terapéuticas de las células madre

La derivación de células madre a partir de blastocitos humanos (**Thomson y col. 1998**) y la obtención de las células iPSCs (**Takahashi y Yamanaka 2006**) inauguraron una nueva era en la investigación con células madre. El enorme potencial de diferenciación de las células madre pluripotentes trae posibilidades revolucionarias en el contexto de la medicina regenerativa. Entre ellas, dirigir la diferenciación de esas células en tipos celulares específicos y la creación de órganos artificiales para tratar una variedad de enfermedades, además de aplicaciones como el estudio de eventos iniciales del desarrollo humano y pruebas de toxicidad de drogas (**Kameoka y col. 2014; Zuba-Surma y col. 2012**). Sin embargo, algunos aspectos técnicos y de seguridad deben tenerse en cuenta en lo que se refiere al uso de estas células en la práctica clínica (**Donovan y Gearhart 2001; Zarzecny y Caulfield 2009; Rezanejad y Matin 2012**). En un gran número de países, existen restricciones legales sobre la obtención de células madre embrionarias o fetales a partir de embriones descartados en procedimientos de fertilización *in vitro* o de fetos humanos abortados, incluso cuando se utilizan para fines de investigación (**Kirkpatrick y col. 2013; Dhar y Hsi-En Ho 2009**).

Por otra parte, la habilidad del cuerpo de reparar y reemplazar células y tejidos de algunos órganos, pero no de otros, es un tema que ha despertado la curiosidad de investigadores desde hace varios años. A este respecto, el descubrimiento de la existencia de células madre en el organismo adulto abrió nuevas perspectivas para la salud comprensión de los mecanismos de reparación del tejido y el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces (**Yuan y Shaner 2013; Donega y col. 2013; Taylor, Jhaveri, y Bartlett 2013**).

Las células madre adultas se definen fundamentalmente como células capaces de autorrenovarse y de dar origen a todas las células maduras del tejido al cual pertenecen.

Estas células proliferan lentamente, dado que se encuentran en nichos específicos (**Chopra, Hans, y Shetty 2013; Castro-Muñozledo 2013; Sequerra y col. 2013**) donde su función primaria es el mantenimiento de la homeostasis tisular (**Valtieri y Sorrentino 2008**). Además, las células madre adultas pueden generar precursores que poseen la capacidad de reparación, que se dividen tras lesiones o enfermedades y dan origen a células diferenciadas (**Bellenchi y col. 2013; Christie y Turnley 2012**), incluso presentando cierta plasticidad, es decir, pudiendo dar origen a células de otros tejidos (**Catacchio y col. 2013**). Debido a las cantidades limitadas de las células madre en el organismo adulto y la dificultad de obtención de las mismas, muchas veces se hace necesario purificar y expandir

esas poblaciones *in vitro* para posibilitar su uso en terapias (**Pastrana, Silva-Vargas y Doetsch 2011; Tara y col. 2014; Haque y col. 2013**).

Por otro lado, el uso terapéutico de células madre adultas ofrece varias ventajas, como la reducción del riesgo de formación de tumores (**Uccelli, Moretta y Pistoia 2008**) y la posibilidad de realización de trasplantes autólogos, evitando posibles cuestiones éticas o legales, así como la posibilidad de rechazo por el paciente después del trasplante. Las células derivadas de la médula ósea del adulto, por ejemplo, están siendo utilizadas con resultados prometedores en diversos modelos experimentales de patologías y lesiones en el sistema nervioso (**Ribeiro-Resende y col. 2009; Pimentel-Coelho 2012**).

#### **1.4.1.2 Células madre mesenquimales**

En la médula ósea, existen dos poblaciones de células madre o estromales: las células madre hematopoyéticas (HSCs), que dan origen a todo el linaje hematopoyético, y las células madre mesenquimales (MSCs) o también llamadas células estromales mesenquimales, que forman las células del tejido conectivo de la médula ósea (**«Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells | stemcells.nih.gov»**). En ese nicho biológico, las MSCs proporcionan además soporte para el mantenimiento y la autorrenovación de las HSCs, protegiéndolas de estímulos apoptóticos (**Kolf, Cho y Tuan 2007; Uccelli, Moretta y Pistoia 2008**).

Las MSCs han sido descriptas como una fuente circulante de células madre adultas de origen mesodérmico (**Minguell, Erices y Conget 2001**). Estas células presentan propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias junto con una especial capacidad de migrar hacia sitios de injuria o remodelación. En respuesta al daño tisular, las MSCs son capaces de cubrir las demandas de regeneración celular del órgano o tejido. Por estas propiedades, entre otras, es que este tipo de células son cada vez más empleadas en investigaciones tanto básicas como aplicadas. En los últimos años se ha avanzado significativamente en el uso de las MSCs como estrategia terapéutica en una gran diversidad de patologías, entre éstas las enfermedades neurodegenerativas (**Tfilin y col. 2010; Zhang y col. 2006; Crigler y col. 2006; Munoz y col. 2005; Yoo y col. 2008; Karussis y col. 2008**).

Las MSCs puede ser aisladas a partir del aspirado de la médula ósea, representando sólo un 0,01 a 0,001% del total de células nucleadas (**Horwitz y col. 2005; Salem y Thiemerann 2010**). Estas células fueron descriptas en 1968 por Friedenstein y colaboradores, que las definieron como "fibroblastos formadores de colonia" por su morfología fibroblastoide característica (**Friedenstein,**

**Chailakhjan y Lalykina 1970**). Posteriormente, se lograron obtener cultivos con propiedades similares a partir de diferentes tejidos u órganos fetales y adultos. Se ha reportado el aislamiento de MSCs a partir de hígado (**Campagnoli y col. 2001**), pulmón (**Fan y col. 2005**), riñón (**Sandeep Gupta y col. 2006**), músculo esquelético (**Williams y col. 1999**), cordón umbilical (**Erices, Conget y Minguell 2000**), tejido adiposo (**Zuk y col. 2001**), entre otros (**Ullah, Subbarao y Rho 2015**). No obstante, por la facilidad de su obtención y accesibilidad a un número adecuado de células, algunos de estos tejidos son preferidos como fuentes de MSCs en vistas a su aplicación en investigación clínica (**da Silva Meirelles, Chagastelles y Nardi 2006**). Por ejemplo, aunque estas células pueden ser aisladas a partir de sangre periférica, las mismas sólo pueden obtenerse en muy pequeñas cantidades, por lo que las fuentes de elección más frecuentes son la médula ósea y el tejido adiposo.

Por otro lado, pueden obtenerse cultivos de MSCs a partir de diversos tejidos extraembriónarios incluyendo la placenta (**In 't Anker y col. 2004**), el amnios (**Marcus y col. 2008**) y el cordón umbilical. En relación con el cordón umbilical, se ha establecido este tipo de cultivos a partir de la totalidad del tejido (**Majore y col. 2011**), del tejido conectivo mesenquimático o gelatina de Wharton (**Karahuseyinoglu y col. 2007**), de la sangre contenida en el cordón umbilical (**Broxmeyer y col. 2006**) o de áreas perivasculares (células perivasculares de cordón umbilical humano, hUCPVCs) (**Sarugaser y col. 2005**). La ventaja adicional de utilizar estos tejidos neonatales es su amplia disponibilidad y ausencia de cuestionamientos éticos ya que se utiliza material de descarte. Se ha sugerido también que las MSCs obtenidas a partir de tejidos neonatales podrían tener una mayor capacidad proliferativa, vida útil y un mayor potencial de diferenciación en comparación con las obtenidas a partir de tejidos adultos (**Hass y col. 2011**).

#### **1.4.1.2.1 Caracterización**

De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, International Society for Cellular Therapy), los requisitos mínimos para definir a las MSCs humanas son (**Dominici y col. 2006; Salem y Thiemermann 2010**):

- morfología fibroblastoide;
- capacidad de adherirse al plástico en cultivo;
- capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos o condrocitos (multipotencialidad) bajo estímulos específicos;

- expresión de marcadores de superficie de origen mesenquimal: CD73, CD90 y CD105;
- ausencia de expresión de marcadores de linaje hematopoyético: CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y el antígeno leucocitario humano (HLA) clase II.

Por otra parte, también se ha reportado que las MSCs podrían diferenciarse a cardiomiositos, células endoteliales, neuronas, hepatocitos y células epiteliales (**Krampera y col. 2007; Pittenger y col. 1999; Sato y col. 2005; Silva y col. 2005**), aunque en varios de estos casos dicha diferenciación parecería ser parcial.

#### 1.4.1.2.2 Mecanismos mediados por las MSCs

Las MSCs desempeñan un papel importante como mediadores tróficos, liberando de manera paracrina sustancias que favorecen la protección y regeneración del tejido (**Caplan y Dennis 2006; Caplan 2009**), como moléculas anti-apoptóticas, antiinflamatorias y factores tróficos tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el IGF-1, etc (**Kurozumi y col. 2005; Krampera y col. 2007; Meirelles y col. 2009**). El trasplante de estas células en cerebro, por ejemplo, también puede estimular el reclutamiento de precursores locales y su posterior diferenciación en células neurales (**Munoz y col. 2005; Uccelli, Moretta y Pistoia 2008**).

Otros mecanismos implicados en la señalización paracrina promovida por estas células incluyen la transferencia de vesículas extracelulares (microvesículas o exosomas) o incluso de mitocondrias sanas, para células dañadas o con función mitocondrial comprometida (**Gatti y col. 2011; Lai, Chen y Lim 2011; Islam y col. 2012**). Ciertamente, se ha demostrado que las MSCs son capaces de transferir micro-RNAs funcionales a las células neurales vía exosomas, después de ser trasplantadas en el cerebro de ratas isquémicas, promoviendo el aumento de la neurogénesis y la angiogénesis (**Xin y col. 2012**).

Otra característica importante de las MSCs es que expresan bajos niveles de moléculas de HLA de clase I y no expresan moléculas de HLA de clase II (**Prockop y Oh 2012**). Esta particularidad, que permite su consideración como células inmunoprivilegiadas, facilita que puedan evadir la respuesta inmunitaria alogénica convirtiéndolas en excelentes candidatos tanto para los trasplantes autólogos como alogénicos (**Le Blanc y Ringdén 2007; Le Blanc y col. 2007**).

Además, las MSCs poseen la capacidad de modular la respuesta inmune, pues ejercen un efecto inmunosupresor, inhibiendo la proliferación de los linfocitos T y B (**Zhi-Gang y col. 2008; Glennie y col. 2005**).

Por último, estas células poseen la capacidad para migrar a áreas dañadas del tejido nervioso (**Barbosa da Fonseca y col. 2009; Assis y col. 2010; Kang y col. 2012**) por lo que resultan de interés terapéutico.

En conjunto, los resultados obtenidos en los modelos animales y en los estudios clínicos evidencian el papel prometedor de las MSCs como alternativa terapéutica para diversas enfermedades neurodegenerativas (**Moraes y col. 2012; Park y col. 2011**), entre ellas la EA, como se describe a continuación.

#### **1.4.1.2.3 Terapia celular en el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer**

La terapia celular surge como una nueva alternativa terapéutica tanto para el envejecimiento no patológico como para diversas enfermedades neurodegenerativas, como la EA. En este sentido, las estrategias terapéuticas con diferentes tipos de células madre buscan impedir o retardar la neurodegeneración progresiva a través de diversos mecanismos, como: 1) la reposición celular, sustituyendo directamente el tipo neural perdido; 2) el soporte trófico, promoviendo la supervivencia de las células afectadas y el reclutamiento de progenitores endógenos, y 3) la modulación de la inflamación (**Lindvall y Kokaia 2010; Lunn y col. 2011**).

Así, el trasplante de células madre neurales o de células pre-diferenciadas puede representar una buena estrategia de tratamiento. No obstante, uno de los mayores desafíos es garantizar que, al ser transplantados, esas células sean capaces de sobrevivir y de integrarse al tejido del cerebro huésped. Se ha demostrado que las células madre neurales humanas, al ser transplantadas en la corteza de roedores, son capaces de diferenciarse en neuronas colinérgicas y de integrarse a los circuitos preexistente (**Liste y col. 2007**). Los modelos animales muestran que parte de los efectos beneficiosos del trasplante de células madre sobre la función cognitiva se debe a la mayor producción de factores neurotróficos (**Blurton-Jones y col. 2009; Tfilin y col. 2010**) que mejoran la supervivencia y la diferenciación de las células progenitoras neurales, y cuyos niveles se encuentran disminuidos durante el envejecimiento y en la EA (**Connor y col. 1997; Li y col. 2009**).

## 1.4.2 Terapia génica

### 1.4.2.1 Generalidades

La terapia génica se define como la transferencia de material genético con fines terapéuticos y tiene numerosas aplicaciones en las ciencias básicas y en la clínica. Típicamente, se refiere al uso de ácidos nucleicos para incrementar, disminuir o suprimir la expresión de una proteína de interés (**De Laporte, Cruz Rea y Shea 2006**). Se puede transferir una diversidad de ácidos nucleicos, tales como genes, oligonucleótidos, ribozimas, aptámeros y ARN pequeños de interferencia (**Patil, Rhodes y Burgess 2005; Basarkar y Singh 2007**).

La terapia génica puede realizarse por medio de estrategias “*ex vivo*” o “*in vivo*”. En las estrategias “*ex vivo*”, se le extraen al paciente las células blanco o las células madre e *in vitro* se les transfiere el material genético (terapéutico); luego estas células son reintegradas al organismo. Estos métodos mejoran la eficiencia de la transferencia génica y minimizan la respuesta inmunológica. Sin embargo, están limitados a las células que están disponibles para su extracción o al cultivo a partir de células madre (**Räty y col. 2008**). En las estrategias “*in vivo*” el material genético se administra directamente al paciente utilizando distintos métodos de transferencia de ácidos nucleicos (**Crystal 2014**).

En general, la captación celular de moléculas de ADN desnudo y polinucleótidos, independientemente de sus tamaños, sigue siendo un proceso ineficiente. Además, estas moléculas son inestables *in vivo*, por ser rápidamente degradadas por exo- y endonucleasas hidrolíticas (**Patil, Rhodes y Burgess 2005**). Consecuentemente, se han desarrollado numerosas estrategias de transferencia de polinucleótidos para facilitar la inserción de dichas moléculas en las células blanco y protegerlas así de la degradación celular. El tipo de molécula terapéutica y el propósito clínico que se persigue determinan la elección de la estrategia a utilizar. Efectivamente, el mayor desafío de la terapia génica es el desarrollo de métodos que transfieran un gen terapéutico (transgén) a las células seleccionadas y que logren una apropiada expresión del gen, sin generar efectos perjudiciales (**Gao, Kim, y Liu 2007**).

Los métodos de transferencia de ácidos nucleicos pueden ser clasificados en físicos y en vectoriales. Generalmente, los métodos físicos inducen lesiones transitorias o defectos en la membrana celular para facilitar el ingreso, por difusión, del ADN a las células blanco (**Gao, Kim y Liu 2007**). Los sistemas de transferencia génica vectoriales, como su nombre lo indica, utilizan vectores para administrar los ácidos nucleicos. Precisamente, los vectores son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia

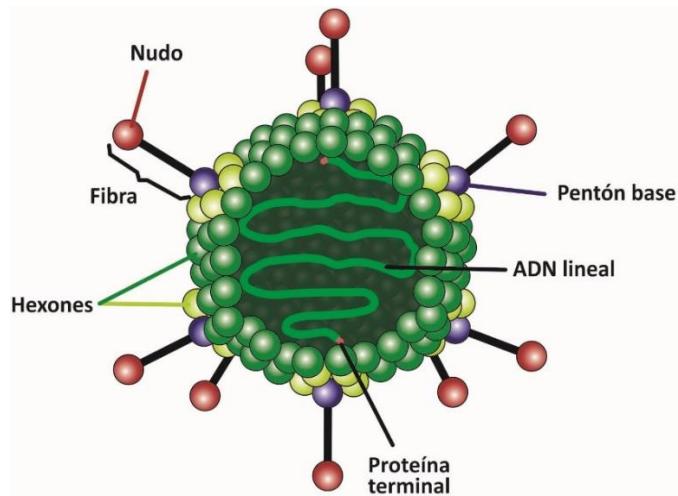
de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y la biodisponibilidad intracelular del mismo, de modo tal que el gen exógeno pueda funcionar correctamente. Los vectores pueden ser clasificados en: vectores no-virales y vectores virales.

La mayoría de los vectores no-virales incluyen el uso de polímeros y lípidos para transferir el material genético al interior celular, protegiendo al ADN de la degradación enzimática (**Basarkar y Singh 2007**). Estos vectores deben superar múltiples barreras a nivel sistémico, tisular y celular, que reducen la eficiencia de la transferencia génica hacia el núcleo. Además, en cada paso se pierde una cantidad significativa de ADN que finalmente resulta en la disminución de la expresión terapéutica del transgén (**Basarkar y Singh 2007; Bergen y col. 2008**). Los virus, en cambio, están altamente especializados en la transferencia de ácidos nucleicos por lo que la realizan con alta eficiencia. Esta es la principal ventaja de la utilización de virus como vectores de transferencia génica. Sin embargo, también poseen desventajas tales como la respuesta inmune que desencadenan, la limitación en el tamaño del transgén que pueden transportar, lo difícil de su producción a escala industrial y la potencial mutagénesis insercional que pueden producir (**Patil, Rhodes y Burgess 2005; Gao, Kim y Liu 2007; Basarkar y Singh 2007**).

#### **1.4.2.2 Vectores Adenovirales**

Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia *Adenoviridae*, siendo los que infectan a mamíferos del género *Mastadenovirus*. Entre los más de cincuenta serotipos descriptos (**Davison, Benko y Harrach 2003**), el más comúnmente utilizado como vector para la transferencia de genes es el Ad5 (**Lentz, Gray y Samulski 2012**). Las partículas adenovirales poseen un tamaño de 70 a 100 nm de diámetro; consisten en una cápside icosaédrica desnuda formada por tres subunidades, el hexón, el pentón y la fibra (**Figura 11**) (**Schaffer, Koerber y Lim 2008**). Actualmente, más de 51 serotipos de Ad han sido aislados en humanos y no humanos y se los han clasificado en subgrupos (de la A a la F).

El genoma de los Ad consiste en ADN lineal de doble cadena de 30 a 38 kpb de tamaño y, en el extremo 5' de cada cadena, se halla unida covalentemente una proteína terminal de 55 kDa. Asimismo, el genoma de los Ad presenta en sus extremos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de aproximadamente 100 pb, esenciales para la replicación del genoma viral (**Krasnykh, Douglas y van Beusechem 2000; Shayakhmetov y col. 2005**).

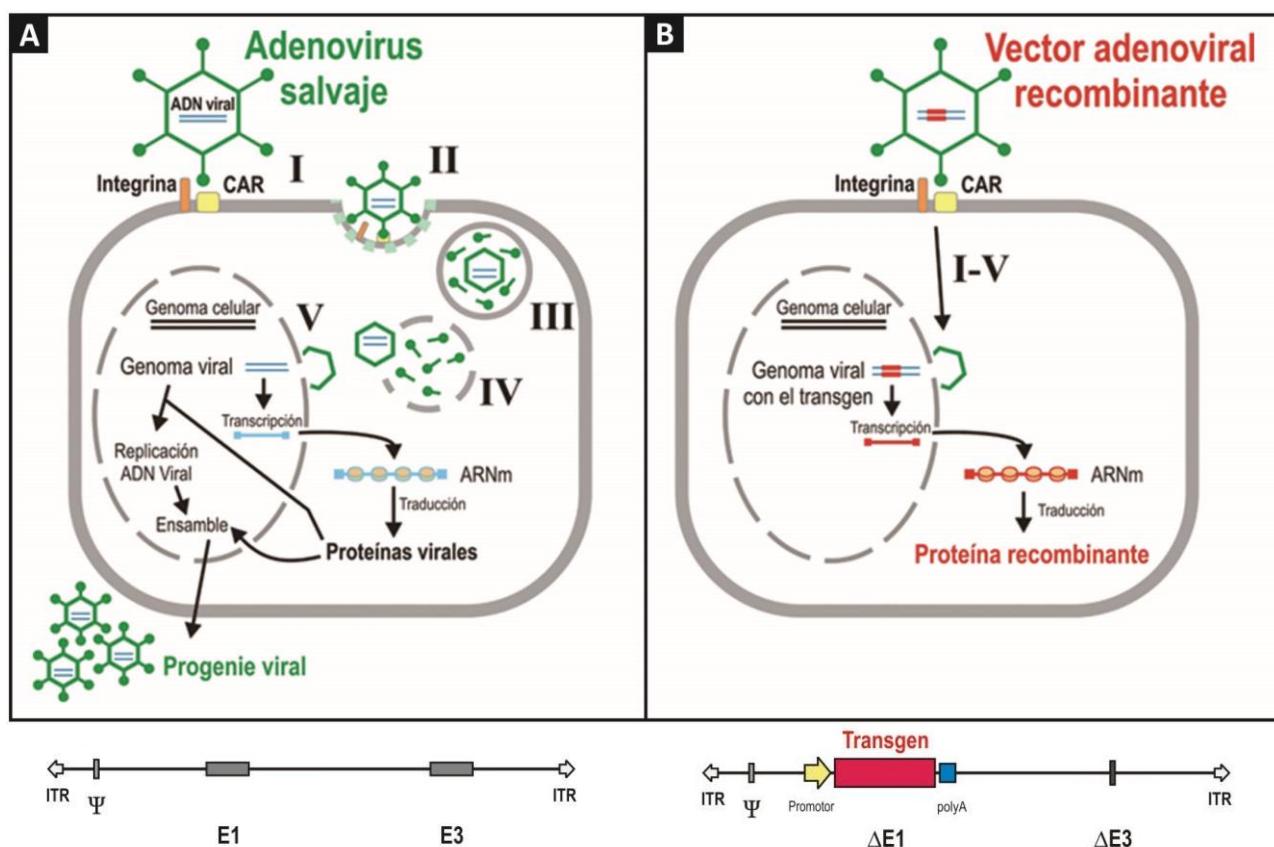


**Figura 11. Esquema de la estructura del adenovirus tipo 5.**

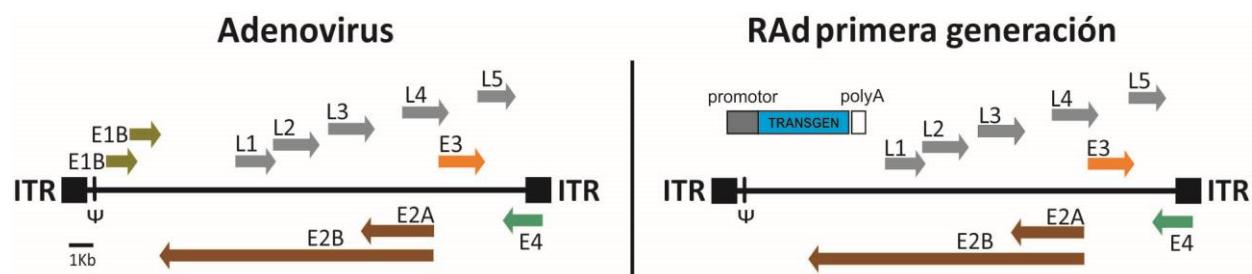
Los Ad son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares (**Crystal 2014**). El Ad5 se une a la célula blanco, inicialmente, por la interacción del botón terminal de la fibra viral con receptores celulares de superficie denominados CAR (**Figura 12A**). Los CAR son un tipo de proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas que intervienen en la endocitosis de la mayor parte de los Ad (**Bergelson y col. 1997**). En adición a estos receptores primarios, las integrinas de la célula hospedadora sirven como co-receptores para la entrada de los Ad (**Hidaka y col. 1999**). Finalmente, el virión se une específicamente al complejo del poro nuclear y el ADN viral ingresa al núcleo (**Figura 12A**) (**Campos y Barry 2007**). En el núcleo el genoma viral permanece en un estado no integrado o episómico y comienzan los procesos de transcripción de los genes virales y de replicación del genoma viral. La transcripción de los genes de los Ad ocurre en dos etapas consecutivas: una fase temprana, durante la cual se expresan los genes tempranos, denominados E (early), y una fase tardía, durante la cual se expresan los genes tardíos, denominados L (late). Los genes E, que comprenden los E1 (A y B), E2 (A y B), E3 y E4 (**Figura 13**), son aquellos que se expresan antes de la replicación del ADN y en su mayoría codifican para proteínas involucradas en la transcripción y la replicación de ADN viral, la supresión de la respuesta inmune y la inhibición de la apoptosis de la célula huésped. Los genes L, que comprenden los L1 a L5 (**Figura 13**), se expresan después de la replicación del ADN y codifican para las proteínas estructurales y para algunas pocas proteínas no-estructurales necesarias para el ensamblaje de la cápside.

La fase tardía en el ciclo infectivo de los Ad se inicia con el comienzo de la replicación viral. Se han desarrollado diversas estrategias para la generación de vectores adenovirales recombinantes (RAdS)

(Figura 12B), las cuales se basan en efectuar modificaciones en el genoma viral en el que subsecuentemente se clona el transgen de interés. La mayor parte de los trabajos con RAds se basó en el uso de Ad humanos tipo 2 y 5 (Glasgow, Everts y Curiel 2006; Schaffer, Koerber y Lim 2008); esto se debe a que sus genomas se encuentran sumamente bien caracterizados y a que demostraron no inducir tumores en modelos animales (Seth 1999). Los primeros vectores Ad en construirse se basaron en supresiones de los genes tempranos E1 y E3 del genoma viral, denominados vectores adenovirales de primera generación (Figura 12B y 13). La eliminación de la región E1 lleva a la incapacidad del virus para replicar y generar progenie (Yeh y Perricaudet 1997; Benihoud, Yeh, y Perricaudet 1999) y la supresión de la región E3 genera más espacio dentro del genoma para clonar secuencias exógenas (hasta 7,5 kpb) (Seth 1999). En consecuencia, estos RAds son incapaces de replicarse (replicación defectiva) evitando así la infección viral generalizada. Generalmente, el sistema utilizado para construir el genoma Ad de primera generación (E1<sup>-/-</sup>, E3<sup>-/-</sup>) se basa en la recombinación homóloga entre un plásmido shuttle, el cual consiste en los extremos del genoma de los Ad y el casete de expresión del transgen en el lugar de la región E1, y un plásmido genómico, el cual consiste en la mayor parte del genoma del Ad, excepto por las regiones E1 y E3 (Crystal 2014).



**Figura 12. Esquemas del ciclo de infección de los adenovirus salvajes y de vectores adenovirales recombinantes.** A: Los Ad salvajes se unen a la superficie celular, primero mediante la interacción CAR-fibra viral y, luego, por la interacción integrina-pentón base (I), que desencadena una cascada de señales y la endocitosis de los viriones en vesículas recubiertas de clatrina (II). El endosoma se acidifica, lo cual causa cambios en la cápside, resultando en la liberación de las fibras, el desensamblaje de los vértices y la exposición de proteínas estructurales (III). Se produce la lisis de la membrana endosomal y el escape de los viriones parcialmente desensamblados (IV). Estos viriones se unen a proteínas del citoesqueleto y llegan a la membrana nuclear donde se unen al complejo del poro nuclear, lo que resulta en el desensamblaje de la cápside y en la liberación del genoma viral dentro del núcleo de la célula hospedadora (V). En el núcleo, el genoma viral permanece como un episoma, se replica y se traducen sus proteínas, primero las necesarias para la replicación del ADN y luego las estructurales. El ADN viral es empaquetado y la cápside se ensambla en el núcleo, de esta manera se genera la progenie viral, que lisa la célula infectada para esparcirse. En la parte inferior de la figura se observa la representación del genoma del Ad salvaje que consta de las ITRs, la señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ) y todos los genes, incluyendo las regiones E1 y E3. B: Los RAd, replicación defectiva, entran a la célula blanco mediante los mismos pasos que los Ad salvajes (I a V). Sin embargo, una vez que el ADN viral, portador del transgén de interés, se encuentra como un episoma en el núcleo, no se produce la replicación del ADN (debido a que carecen de la región E1), ni se producen nuevas partículas virales. Por lo tanto, el transgén se expresa produciendo grandes concentraciones de la proteína recombinante (típicamente detectable dentro de las 24 hs). En la parte inferior se observa la representación del genoma del RAd que carece de las regiones E1 y E3 ( $\Delta E1$  y  $\Delta E3$ ) y contiene el resto de los genes virales, las ITRs, la señal de empaquetamiento y, en la región  $\Delta E1$ , el casete de expresión del transgén de interés, con un promotor y una señal de poliadenilación.



**Figura 13: Representación esquemática de la organización genética de los Ad y su vector de primera generación.** En los vectores Ad se indica la localización de la inserción del casete portador del transgén. ITR, Repeticiones terminales invertidas.  $\Psi$ , señal de empaquetamiento. Adaptado de: (Giacca 2007).

Estos RAds pueden replicarse en líneas celulares específicas, como la línea celular transgénica embrionaria derivada de riñón humano 293 (HEK 293), que contiene la región genómica E1 faltante del Ad5 y, por lo tanto, expresa los genes necesarios para iniciar la replicación (**Graham y Prevec 1992**). En dichas células se pueden amplificar los RAds, obteniéndose títulos muy elevados (**Campos y Barry 2007**).

Un factor importante a considerar en los estudios *in vivo*, con animales de experimentación, es la duración de la expresión del transgén mediada por los Ad. Generalmente, el nivel de expresión del transgén tiene un pico de expresión durante los primeros 7 días y disminuye rápidamente a valores indetectables entre la segunda y la cuarta semana. Esto se observa para la mayoría de las rutas de administración con la excepción de la inyección directa en tejidos inmunoprivilegiados, tal como lo es el cerebro (**Crystal 2014**).

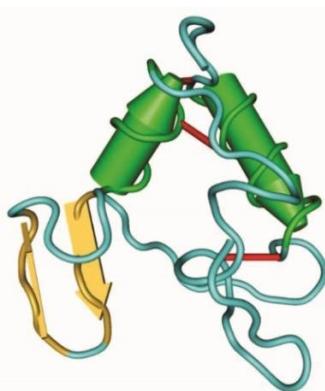
Los RAds cuentan con algunas ventajas respecto a los otros vectores virales: i) son capaces de transducir eficientemente un amplio rango de tejidos y tipos celulares, en estado proliferativo o quiescente; ii) poseen una gran capacidad de clonado; iii) son fáciles de manipular en el laboratorio; iv) son factibles de producirse en títulos elevados; v) el genoma de los RAds no se integra al genoma de la célula huésped, permanece en un estado episómico, descartando el riesgo de mutagénesis insercional; y vi) poseen una alta eficiencia de expresión génica (**Yeh y Perricaudet 1997; Benihoud, Yeh y Perricaudet 1999; Schaffer, Koerber y Lim 2008**). Sin embargo, los vectores Ad poseen una importante limitación, la intensa respuesta inmune que inducen en el hospedador, dirigida contra la partícula viral y las células infectadas. Como consecuencia de dicha respuesta se limita la duración de la expresión del transgén (la cual generalmente es transitoria). Sin embargo, elegimos para el presente trabajo a los vectores adenovirales de primera generación en base a las siguientes razones:

- 1) Se consideraron las ventajas, antes mencionadas, de los Ad respecto a los otros vectores virales y se especuló que la respuesta inmune desencadenada por estos vectores, su principal desventaja, podría verse atenuada al implementar la terapia génica en el cerebro, un sitio de inmunoprivilegio.
- 2) Durante los últimos 15 años hemos desarrollado la tecnología necesaria para la construcción de vectores adenovirales recombinantes de primera generación, por lo que esta tecnología estaba bien establecida en nuestro laboratorio al momento de trazarse los objetivos de esta tesis.

### 1.4.3 Factores Tróficos

#### 1.4.3.1 Factor de Crecimiento símil Insulina tipo 1 (IGF-1)

El IGF-1 es un polipéptido (**Figura 14**) que pertenece a la familia de la insulina (**Blundell y Humbel 1980**) y es sintetizado en múltiples órganos incluyendo hígado, pulmones, riñones, timo, corazón, músculo, gónadas y cerebro (**D'Ercole, Stiles y Underwood 1984**). Sin embargo, la mayoría del IGF-1 circulante es secretado por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento. De esta forma, el IGF-1 media la actividad anabólica y mitogénica de dicha hormona, ejerciendo acción paracrina en los diferentes tejidos (**Laron 2001**).



**Figura 14. Estructura del IGF-1.**

En el medio extracelular el IGF-1 se une a moléculas con las que tienen alta afinidad, llamadas proteínas de unión a los factores de crecimiento símil insulina (IGFBPs). Las IGFBPs son capaces de regular la cantidad de IGF-1 en circulación, su transporte hacia células y tejidos determinados, su disponibilidad para interaccionar con sus receptores específicos y la acción del IGF-1 en sus células diana, potenciándola o inhibiéndola (**Clemons 1990; Firth y Baxter 2002**). La mayoría de las funciones biológicas del IGF-1 se producen a través de la unión a su receptor, R-IGF-1, un receptor heterotetramérico compuesto por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos subunidades  $\beta$  transmembrana, unidas por puentes disulfuro. La subunidad  $\alpha$  posee el sitio de unión a ligando, en tanto que la subunidad  $\beta$  posee actividad tirosina quinasa (**LeRoith y col. 1995**). El R-IGF-1 se autofosforila al ser activado por IGF-1 y también es capaz de fosforilar otros sustratos que contienen tirosinas, tales como el IRS-1 y la proteína adaptadora activadora de quinasas. La fosforilación de IRS-1 activa la vía de la enzima fosfatidil-inositol-3 quinasa, la cual está implicada en procesos celulares de crecimiento y antiapoptóticos (**Yuan y Yankner 2000**). La fosforilación de la proteína adaptadora lleva a la activación de quinasas relacionadas con la diferenciación celular (**Kim y col. 1998; Kurihara**

y **Hakuno**) y con la regulación de la maquinaria de apoptosis (**Hwang, Kwon y Nam 2007**). Además, se ha encontrado al R-IGF-1 en el núcleo, lo cual sugiere que éste pueda actuar directamente como un factor de transcripción (**Hawkes y col. 2006**).

#### **1.4.3.1.1 IGF-1 en el sistema nervioso central**

El IGF-1 es un potente factor neurotrófico y neuroprotector, considerado de interés para el rescate neuronal en procesos neurodegenerativos (**Carro y col. 2006**). El IGF-1, el R-IGF-1 y las IGFBPs están localizados y son sintetizados en el SNC, pudiendo actuar de manera paracrina en algunas áreas del cerebro (**Marks, Porte y Baskin 1991; Ocrant, Fay y Parmelee 1990**). El IGF-1 posee acciones neurotróficas observadas en cultivos de líneas celulares neuronales y en cultivos primarios neuronales, tales como la proliferación celular, la supervivencia, el crecimiento de las neuritas y la diferenciación (**Werther, Cheesman y Russo 1993; Torres-Aleman, Naftolin y Robbins 1990; Torres-Aleman, Pons, y Santos-Benito 1992; Brooker y col. 2000**). También se ha demostrado que el IGF-1 es un modulador específico de la formación de sinapsis, la liberación neurotransmisores y la excitabilidad neuronal (**O'Kusky, Ye y D'Ercole 2000; Torres-Aleman 1999**).

Después del nacimiento, la expresión de IGF-1 desciende hasta alcanzar niveles muy bajos en el cerebro adulto (**Miller y Gore 2001**). Sin embargo, en respuesta a diferentes daños, el cerebro produce factores de crecimiento, incluyendo el IGF-1 (**Kazanis y col. 2004**), hallazgo que impulsó el estudio de los efectos del IGF-1 frente a diversos tipos de injuria. Efectivamente, la lesión electrolítica del hipocampo induce un aumento del IGF-1 extracelular en la zona lesionada (**Yamaguchi y col. 1991**). De manera similar, se sabe que, en condiciones de daño citotóxico del hipocampo, la microglía de esta región aumenta sustancialmente la producción del IGF-1 (**Breese y col. 1996**). Además, se ha demostrado que en situaciones de estrés oxidativo el IGF-1 ejerce una acción protectora sobre los astrocitos y, de esta forma, colabora con ellos en la protección neuronal (**Genis y col. 2014**).

El descenso en los niveles cerebrales de IGF-1 se relaciona con el deterioro de las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento y a otras enfermedades neurodegenerativas (**Rivera y col. 2005; Steen y col. 2005**). En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, el IGF-1 demostró estar involucrado en la protección neuronal contra la degeneración que presentan las neuronas dopaminérgicas en esta patología (**Ebert y col. 2008; Fan y col. 2018**). Además, en la esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad caracterizada por una progresiva disminución de motoneuronas, estudios preclínicos

han evidenciado que el IGF-1 es capaz de atenuar la pérdida neuronal y mantener las sinapsis y las uniones neuromusculares (**Lunn y col. 2015**).

Por otro lado, se ha empleado la inyección icv del IGF-1 en diferentes modelos experimentales con fines neuroprotectores. Precisamente, estudios de isquemia cerebral inducida en ratas han revelado que la administración del IGF-1 reduce un 40 % el volumen del infarto cerebral (**Brywe y col. 2005; Kooijman y col. 2009**). En ratas seniles, la administración del IGF-1 restaura la tasa de neurogénesis en el hipocampo (**Lichtenwalner y col. 2001**) y, parcialmente, su déficit cognitivo (**Markowska, Mooney y Sonntag 1998**).

Gradualmente se está acumulando evidencia que le otorga al IGF-1 un papel sumamente relevante en la EA. Ciertamente, debido a que el IGF-1 sérico entra en el cerebro de una manera actividad-dependiente (**Nishijima y col. 2010**) y a que la actividad del cerebro está desregulada en la EA (**Jones y col. 2011**), es probable que el tráfico del IGF-1 sérico al cerebro se encuentre perturbado en la EA (**Zemva y Schubert 2014; Trueba-Sáiz y col. 2013**). Esto concuerda con una reducción en la relación del IGF-1 en el LCR/plasma de pacientes con EA (**Johansson y col. 2013; Westwood y col. 2014**). Por otra parte, cuando se evaluó el efecto del IGF-1 sobre cultivos de neuronas hipocampales de rata tratados con derivados del péptido  $\beta$ A, fue posible prevenir y rescatar a los cultivos del daño neurotóxico (**Doré, Kar y Quirion 1997**). Sumado a la información anterior, en ratones transgénicos que sobreexpresan el péptido  $\beta$ A, el IGF-1 protege a las neuronas del hipocampo de los efectos tóxicos de dicho péptido (**Doré, Kar y Quirion 1997**) y reduce su carga cerebral, así como la gliosis asociada a las placas amiloides, mejorando la performance cognitiva de los animales (**Carro y col. 2006**).

En conjunto toda la evidencia existente justifica la utilización del IGF-1 como agente neuroprotector.

#### **1.4.3.1.2 Terapia génica con IGF-1**

Un estudio de nuestro grupo, utilizando un adenovirus recombinante portador del gen para el IGF-1 de rata (RAd-IGF-1), demostró que la ruta ependimaria es una estrategia efectiva para incrementar los niveles de IGF-1 en el LCR (**Hereñú y col. 2009**). Se evaluó entonces la terapia génica icv con IGF-1 en ratas seniles observándose impacto beneficioso en el desempeño motor de los animales (**Nishida y col. 2011**). Así mismo, se evidenció una mejora significativa en la memoria espacial de ratas seniles luego de la terapia icv con RAd-IGF-1, junto con un incremento de la neurogénesis y de la arborescencia astrocitaria hipocampal (**Pardo y col. 2016**). Luego, se llevó a cabo un primer

abordaje de terapia con IGF-1 a largo plazo para tratar memoria espacial en ratas viejas; el secuenciamiento de ARN de hipocampo total mostró que numerosos genes relacionados con la plasticidad sináptica y función neuronal en general, están diferencialmente expresados en dichas ratas tratadas con el RAd-IGF-1 (**Pardo y col. 2017**).

Previamente demostramos también que la terapia génica con IGF-1 en el hipotálamo de ratas hembras seniles con neurodegeneración dopaminérgica es altamente efectiva para restaurar la función neuronal hipotalámica involucrada en el control inhibitorio de la prolactina, corrigiendo de este modo la hiperprolactinemia crónica en estos animales (**Hereñú y col. 2007**).

En un trabajo adicional de nuestro laboratorio, se estudió el impacto de la terapia génica con IGF-1 sobre el eje hipotalámico-ovárico en ratas de mediana edad, reproductivamente competentes; la sobreexpresión de IGF-1 en el hipotálamo medio basal de ratas hembras de mediana edad prolongó la función ovárica (**Rodríguez y col. 2013**).

En base a estos resultados, consideramos al estudio de la terapia génica con IGF-1 como un abordaje sumamente relevante en nuestros modelos de neurodegeneración.

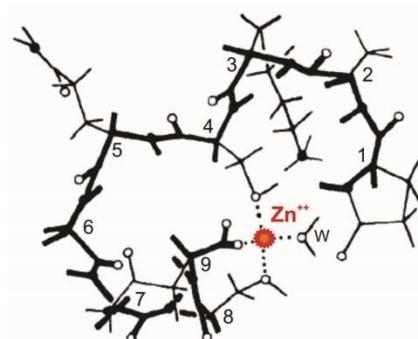
#### 1.4.3.2 Timulina

La existencia de un factor tímico presente en el suero normal y en extractos tímicos ha sido descripta por Bach y Dardenne (**Bach y Dardenne 1973**). Dicho factor consiste en un nonapéptido de 847 daltons de peso molecular que fue denominado factor tímico sérico (FTS) (**Bach y col. 1977**).

La ausencia del FTS en el suero de ratones timectomizados y de ratones congénitamente atípicos (*nude*) y su presencia tras el trasplante de timo, demostró su exclusivo origen tímico (**Bach y Dardenne 1973**). En efecto, mediante diferentes técnicas de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica e inmunoelectromicroscopía utilizando anticuerpos anti-FTS pudo confirmarse la localización del FTS en el citoplasma de las células epiteliales tímicas (CET) (**Schmitt y col. 1980; Auger y col. 1984**). El cultivo primario de las CET humanas tratadas con tres inhibidores del movimiento vesicular indujo una disminución del FTS liberado y un aumento en el número de células marcadas con anti-FTS monoclonal. Esto sugirió que el péptido es secretado por exocitosis (**Savino y Dardenne 1986**).

La secuencia de aminoácidos del FTS circulante, aislado originalmente de suero de cerdo, fue establecida a partir del péptido intacto y del péptido tratado con enzimas proteolíticas: pyroGlu-Ala-

Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH (**Pleau y col. 1977**). En base a esto, para confirmar la estructura primaria completa así generada, se sintetizó un nonapéptido (**Figura 1.15**) que se coordina al ión Zn<sup>2+</sup> en una relación equimolecular (**Gastinel y col. 1984**), el cual le confiere su actividad biológica característica (**Dardenne y col. 1982**). A raíz de estos estudios pioneros, el complejo activo formado por FTS-Zn fue denominado “timulina”. La actividad biológica de esta hormona fue evaluada por un bioensayo desarrollado por Dardenne y Bach (**Dardenne y Bach 1975**), que utilizó la formación de rosetas a partir de glóbulos rojos de oveja (el mismo se describirá en Materiales y Métodos del Capítulo VII). Desde que se desarrolló este bioensayo, a principios de los años 70, ha sido utilizado para medir los niveles de timulina en fluidos biológicos (**Bach, 1983**). En el humano, los niveles más elevados de timulina sérica se han detectado desde el período neonatal hasta la adolescencia, momento en el que comienzan a declinar alcanzando valores muy bajos a los 36 años; a partir de este momento, permanecen constantes durante el envejecimiento (se dosó hasta los 80 años) (**Consolini y col. 2000**).



**Figura 15:** Representación espacial que muestra la relación estequiométrica 1:1 en el complejo FTS-Zn. Los residuos Ser4-OH, Ser8-OH y Asn9-COOH son los que se coordinan al ion Zn<sup>2+</sup>, siendo el cuarto ligando una molécula de agua (w). Los números representan los nueve aminoácidos que forman el FTS, comenzando en el grupo N-terminal. Adaptado de: (**Cung y col. 1988**).

#### 1.4.3.2.1 Potencial terapéutico de la timulina

La timulina ejerce distintas acciones sobre el sistema inmune. Entre las más importantes puede mencionarse su participación en la diferenciación de los linfocitos T y en la modulación de la mayoría de sus funciones.

Los primeros usos terapéuticos de la timulina se focalizaron en el tratamiento de ciertas patologías autoinmunes (**Bach, Dardenne y Goldstein 1984**). Diversos estudios muestran que la timulina es

capaz de modular procesos inflamatorios a nivel central, periférico y local. Efectivamente, se ha documentado que niveles elevados de timulina inducen una atenuación de la respuesta inflamatoria celular por la inhibición local de la síntesis de citoquinas proinflamatorias y quimoquinas (**Bach 1983; Kanaan y col. 2002; Henriques-Coelho y col. 2008**). Recientemente, la terapia con timulina unida a nanopartículas suprimió la respuesta proinflamatoria en ratones tratados con LPS, lo que indica el potencial de dicha terapia en el tratamiento de la sepsis (**Novoselova y col. 2018**).

Además, la timulina ha demostrado ejercer una acción antiinflamatoria sobre el SNC y, de esta manera, se le otorga un rol potencialmente neuroprotector. Precisamente, en un modelo de inflamación cerebral por inyección icv de LPS, el pretratamiento icv con timulina o con un péptido sintético análogo a la timulina, redujo la hiperalgesia y atenuó los niveles elevados de mediadores proinflamatorios en diferentes áreas del cerebro (**Safieh-Garabedian y col. 2002; Safieh-Garabedian y col. 2003; Safieh-Garabedian y col. 2011**).

Aún no se conoce el mecanismo preciso mediante el cual la timulina ejerce su protección en los tejidos dañados y en las alteraciones mencionadas. Se ha demostrado que este péptido es capaz de incrementar los niveles de la enzima superóxido dismutasa en ratones con senescencia acelerada (**Zhao y col. 1990**), sugiriendo que tal vez actúe alterando la producción de radicales libres.

En humanos y animales, se ha demostrado que el envejecimiento conduce a una severa involución del timo (**Goff y col. 1987; Goya y col. 1992; Consolini y col. 2000**). Por otra parte, la mayoría de las enfermedades que desarrollan un cuadro de inmunodeficiencia presentan atrofia tímica y anormalidades en las CET. Además, en todos los casos se ha observado una significativa reducción en los niveles séricos de timulina (**Safieh-Garabedian y col. 1992**). Si bien no existe evidencia de que la caída en los niveles circulantes de timulina juegue un rol causal en las patologías autoinmunes, resulta plausible suponer que la terapia de reemplazo con timulina podría atenuar algunos de los síntomas asociados a estas enfermedades o al envejecimiento (**Iwata y col. 1981**). En estudios de niños y adultos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, se observó que sus niveles de timulina sérica se encontraban disminuidos en comparación con voluntarios saludables (**Dardenne y col. 1982, 198; Safieh-Garabedian y col. 1992**). La disminución en los niveles séricos de timulina y las anomalías de los linfocitos T en estos pacientes, apoya la hipótesis de que la timulina juega un rol relevante en el mantenimiento de una inmunocompetencia normal (**Safieh-Garabedian y col. 1992**).

Se han realizado algunos abordajes clínicos preliminares con timulina sintética. En pacientes con síndrome de DiGeorge, la timulina restauró el número y la función de los linfocitos T. En tres casos

de niños con síndrome de inmunodeficiencia, la administración iv de timulina sintética indujo una mejoría clínica general, una disminución de la frecuencia de las infecciones, una corrección del déficit de linfocitos T y una rápida producción de IgA (**Bordigoni y col. 1982**).

#### **1.4.3.2.2 Terapia génica con timulina**

Nuestros primeros estudios de la timulina se centraron en su acción hipofisotrófica (**Zaidi y col. 1988; Brown y col. 2000**). En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha implementado terapia génica neonatal para esta hormona en ratones hembra *nude*, congénitamente atípicos, utilizando un vector adenoviral recombinante que expresa, constitutivamente, un gen sintético para el análogo biológicamente activo de timulina: el decapéptido metFTS. Mediante dicha terapia se lograron restaurar los niveles de timulina sérica y prevenir las alteraciones a nivel hipotalámo-gonadotropo-ovárico que típicamente ocurren en estos ratones en la adultez (**Goya y col. 2007; Reggiani y col. 2009**).

Debido a los antecedentes de la acción antiinflamatoria de la timulina en el SNC (**Safieh-Garabedian y col. 2003**), consideramos de interés contar con una herramienta terapéutica que nos permita sobreexpresar esta hormona para, posteriormente, realizar terapia génica antiinflamatoria en nuestros modelos de neurodegeneración.

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general en el que se enmarca la presente Tesis es el desarrollo de estrategias terapéuticas de avanzada que nos permitan prevenir y/o subsanar las alteraciones funcionales y estructurales relacionadas con la edad. En este contexto, el uso de MSCs y la terapia génica con potentes moléculas neuroprotectoras, tales como el IGF-1 y la timulina, emergen como abordajes terapéuticos promisorios.

### 2.1 Hipótesis

Las hipótesis centrales de la presente tesis son:

- Que la terapia con MSCs constituirá una estrategia efectiva para el tratamiento de neuropatologías, debido a su potencial regenerativo, antiinflamatorio y terapéutico. Suponemos que las MSCs ejercerán un efecto restaurativo sobre la morfología y bioquímica del hipocampo y sobre la performance cognitiva de nuestros modelos de neurodegeneración.
- Que la terapia génica con IGF-1 constituye una estrategia neuroprotectora efectiva para el tratamiento de neuropatologías. Suponemos que la sobreexpresión del IGF-1 *in situ* será neuroprotectora, estimulará la neurogénesis y consolidará la memoria en modelos de EA.
- Que el desarrollo de un vector adenoviral recombinante para timulina y de un gen reportero que permita monitorear la expresión de dicho gen terapéutico, constituye una herramienta promisoria para el abordaje de patologías neuroinflamatorias.

### 2.2 Objetivos específicos

Dado este marco conceptual general, los objetivos específicos propuestos fueron los siguientes:

1. Estudiar el efecto de la terapia celular con MSCs utilizando la rata senil como modelo de envejecimiento.
2. Validar el modelo de EAE, generado por la administración de STZ-icv, mediante estudios de comportamiento y morfológicos en el hipocampo de rata.
3. Evaluar la eficacia de la terapia con MSCs en el modelo animal de EAE previamente validado mediante la administración sistémica de MSCs.

4. Evaluar el potencial terapéutico del IGF-1 mediante la implementación de terapia génica en dos modelos experimentales de EA: *in vitro*, en cultivos primarios de neuronas hipocampales tratados con O $\beta$ As; *in vivo*, en ratones con administración de O $\beta$ As -icv.
5. Generar un sistema bidireccional regulable Tet-Off de dos vectores que exprese el gen sintético para timulina y un gen reportero. Se propone evaluar su funcionamiento *in vitro* e *in vivo*.

## **CAPÍTULO III: TERAPIA CELULAR EN EL MODELO *IN VIVO* DE ENVEJECIMIENTO, LA RATA SENIL (*Objetivo específico 1*)**

La obtención y caracterización de las MSCs estudiadas en el presente capítulo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires, en colaboración con la Dra. Mariana G. García y el Dr. Guillermo Mazzolini. Los experimentos de terapia celular en el modelo de rata senil se llevaron a cabo en nuestro Laboratorio, INIBIOLP, FCM - UNLP.

### **3.1 Reseña introductoria**

Nuestro grupo ha estudiado extensamente el envejecimiento cerebral en ratas SD hembras, evidenciando el deterioro de la memoria espacial y la activación significativa de la microglía reactiva en el hipocampo. Un hallazgo interesante es que las MSCs pueden controlar la activación de la microglía mediante la producción de varios factores, lo que sugiere que estas células podrían ser una herramienta terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades asociadas con la hiperactividad microglial. Además, las MSCs son conocidas por su potencialidad para promover la neurogénesis y la supervivencia de las células neurales al expresar factores neurotróficos.

La información anterior nos llevó a explorar el potencial neuroprotector de las MSCs derivadas de médula ósea humana (hBM-MSCs), de fácil aislamiento y expansión, en el hipocampo de ratas seniles a nivel funcional y morfológico. El presente capítulo describe estudios en los que evaluamos el efecto de la administración icv de hBM-MSCs sobre la memoria espacial y la morfología del hipocampo de ratas seniles.

### **3.2 Materiales y métodos**

#### **3.2.1. Aislamiento y caracterización de las hBM-MSCs**

Las hBM-MSCs se aislaron a partir de aspirados de médula ósea de donantes sanos para trasplante alogénico después del consentimiento informado, aprobado por el Comité de Revisión Institucional del Hospital Naval Pedro Mallo y la Fundación Instituto Leloir, Argentina, de acuerdo con las pautas de la ISCT (**García y col. 2011**).

Las MSCs se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo bajo en glucosa (2 µM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina) y SFB al

20 % (Internegocios S.A., Argentina). Las células adherentes se cultivaron y se utilizaron entre los pasajes 4 a 7.

Las características fenotípicas de las hBM-MSCs se determinaron mediante citometría de flujo con anticuerpos anti-humano específicos contra CD14, CD34, CD44, CD73, CD90 y CD105 (BD Biosciences), incubados durante 30 min. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) y los datos adquiridos se analizaron con el software Cyflogic (CyFlo Ltd.) (**Aquino y col. 2010**).

### **3.2.2. Marcación fluorescente de las MSCs**

Las hBM-MSCs se cultivaron en placas de Petri hasta un 90 % de confluencia. Las MSCs se marcaron en suspensión con el colorante fluorescente 1,10-dioctadecil-3,3,30,30-tetrametil indocarbocianina perclorato (Dil, Sigma Chemical Company. Solución madre: 0,25 µg de Dil por microlitro de dimetilsulfóxido). Brevemente, las MSCs tripsinizadas se suspendieron en solución buffer fosfato salina (PBS,  $10^6$  células/ml) en presencia de Dil a una concentración final de 1 µg/ml. Luego, se incubaron durante 5 min a 37 °C, seguido de 15 min a 4 °C y, finalmente, 3 lavados con PBS. Se realizó una dilución apropiada ( $6,25 \times 10^4$  células/µl) para la inyección icv.

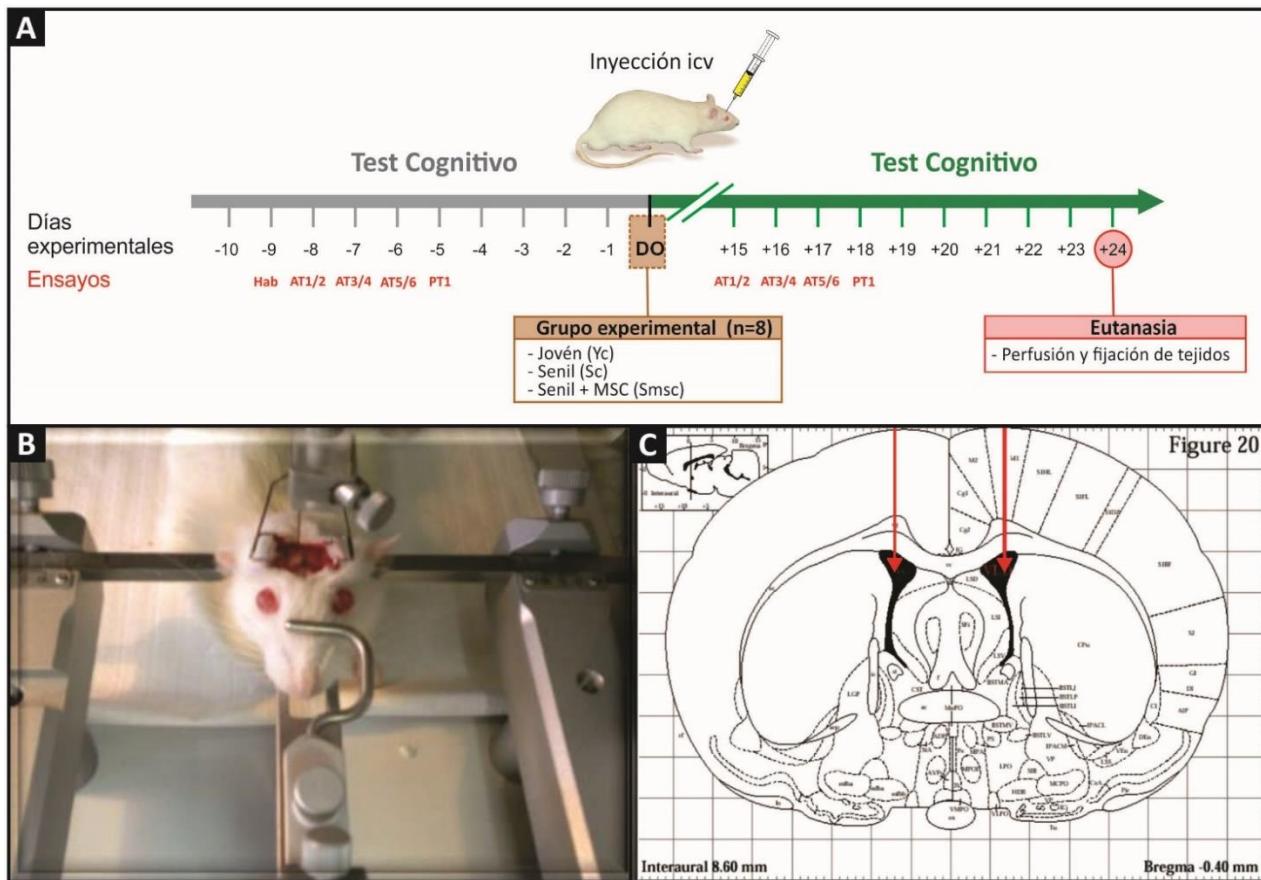
### **3.2.3. Animales y diseño experimental**

Se utilizaron ratas hembras SD jóvenes (3 meses) y seniles (27 meses). Los animales se alojaron en una habitación con temperatura controlada (22-24 °C), ciclos de 12 hs de luz / 12 hs de oscuridad (luces de 7 am a 7 pm), con alimento y agua disponibles a voluntad. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas de bienestar animal del NIH (A5647-01). La aceptabilidad ética de nuestros protocolos animales fue aprobada por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCM, UNLP (P05-02-2015).

Las ratas se agruparon de la siguiente manera: I- **Yc**, ratas jóvenes que no recibieron tratamiento; II- **Sc**, ratas seniles que no recibieron tratamiento y; III- **Smsc**, ratas seniles inyectadas estereotáxicamente con hBM-MSCs. N= 8 ratas por grupo.

El día de la inyección de las MSCs fue establecido como el día experimental (DEx) 0. Antes y después de la terapia celular, se realizó para todos los animales el test completo del laberinto de Barnes (BM) que comprendió seis ensayos de adquisición (AT) y un ensayo de prueba (PT). Se usaron ratas jóvenes adicionales para el estudio temporal de las MSCs en el sistema cerebroventricular.

**Diseño experimental:** nueve días antes de la inyección de MSCs (DEx -9), comenzó el test BM del pre-tratamiento. En el DEx 0, las ratas seniles fueron inyectadas con MSCs-icv como se describe a continuación. Desde el DEx 15 al 18, los animales se sometieron al test BM del post-tratamiento (**Figura 16.A**). El último día (DEx 24), se realizó la eutanasia de las ratas como se describe a continuación.

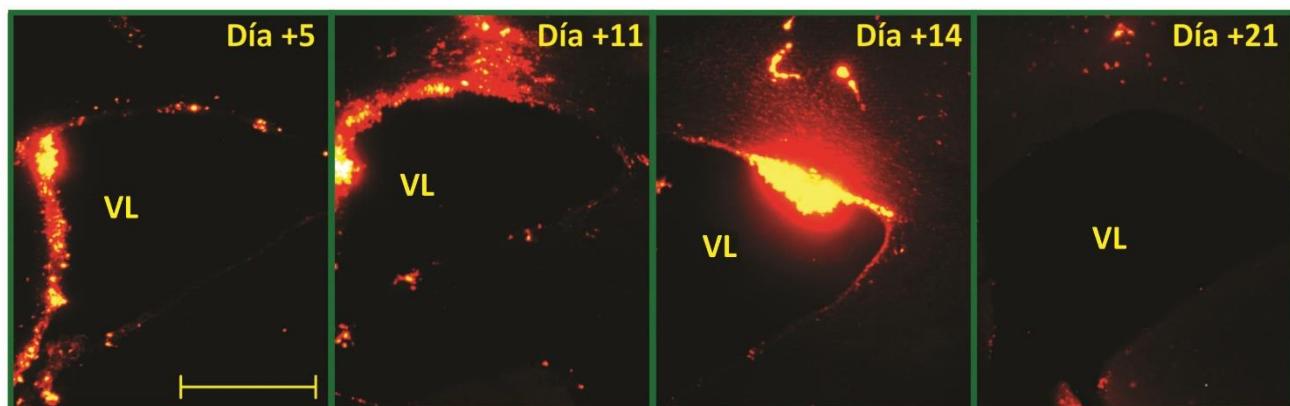


**Figura 16. Diseño experimental e inyección estereotáctica.** Diseño experimental del estudio (A). Todos los animales se sometieron a 2 AT diarios desde el DEx -9 al -6 y a un PT en el DEx -5. Las hBM-MSCs se inyectaron estereotácticamente (B) en los LV (C, flechas rojas) de las ratas Smsc en el DEx 0. Los animales Yc y Sc no recibieron tratamiento. Desde el DEx 15 al 18, todas las ratas recibieron una segunda serie (posttratamiento) de AT y un PT en el DEx 18. El DEx 21 se realizó la eutanasia, se perfundieron y se extrajeron los cerebros de las ratas para el análisis morfológico. Abreviaturas: DEx, día experimental; icv, intracerebroventricular; Hab, habituación; AT, ensayo de adquisición; PT, ensayo de prueba; LV, ventrículos laterales.

### 3.2.4. Diseño del estudio temporal

Se usaron ratas jóvenes adicionales ( $N = 8$ ) para el estudio temporal. En el DEx 0, las ratas se inyectaron con MSCs-icv marcadas con Dil. Se realizó la eutanasia de las ratas a diferentes tiempos,

en los DEx 5, 11, 14 y 21, y los cerebros se procesaron por inmunohistoquímica (IHQ) para analizar la distribución y la permanencia de las células inyectadas (**Figura 17**).



**Figura 17. Estudio temporal de las hBM-MSC en los ventrículos cerebrales.** Microscopía de fluorescencia de secciones cerebrales en diferentes momentos después de la inyección icv de hBM-MSCs marcadas con Dil. La cantidad de hBM-MSC en los ventrículos cerebrales disminuyó lentamente y la mayoría de las células permanecieron en contacto con la capa de células ependimarias. Se puede observar un número moderado de células fluorescentes en el parénquima cerebral, próximo a las células ependimales. No se observó fluorescencia en otras estructuras cerebrales distales a los espacios ventriculares. Abreviaturas: VL, ventrículo laterale; Barra de escala 500  $\mu$ m.

### 3.2.5. Inyecciones estereotáxicas

Las ratas se anestesiaron con clorhidrato de ketamina (40 mg/kg de peso corporal (PC), ip) más xilacina (8 mg/kg de PC, im) y se colocaron en un aparato estereotáxico. Para acceder a los ventrículos laterales (VL), la aguja 26G de una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l se localizó en las siguientes coordenadas en relación con el bregma: -0,8 mm anteroposterior; 4,1 mm dorsoventral y;  $\pm$  1,5 mm mediolateral (Paxinos G y Watson C 1998). Los animales fueron inyectados bilateralmente (8  $\mu$ l por lado) con una suspensión que contenía  $5 \times 10^5$  MSCs (**Figura 16.B-C**).

### 3.2.6. Evaluación de la memoria espacial

Se utilizó un protocolo modificado del test BM previamente documentado por nuestro grupo (**Morel y col. 2015**). Implica tres fases: habituación, entrenamiento (ensayos de adquisición) y prueba. Consiste en una plataforma circular de acrílico negro elevada (108 cm en el suelo), de 122 cm de diámetro, la cual contiene 20 agujeros alrededor de la periferia. Los agujeros tienen un diámetro uniforme (10 cm) y solo uno de ellos está conectado a una caja de escape negra. La caja de escape posee 38,7 cm de largo x 12,1 cm de ancho x 14,2 cm de profundidad y es removible. Se utiliza una cámara cilíndrica blanca de partida (opaca y abierta, de 25 cm de diámetro y 20 cm de altura) para

colocar las ratas en el centro de la plataforma. Se colocan en la sala cuatro señales visuales, a 50 cm de distancia de la plataforma circular. El orificio de escape se numera como agujero 0 para fines de representación gráfica, mientras que los agujeros restantes están numerados del 1 al 10 en el sentido de las agujas del reloj y de -1 a -9 en el sentido antihorario (**Figura 21.A**).

Durante todo el experimento, el agujero 0 permaneció en un lugar fijo para evitar la aleatorización de la posición relativa de la caja de escape. Un generador de ruido blanco de 90 dB y una bombilla de luz blanca de 500 W proporcionaron los estímulos de escape de la plataforma. Al comienzo del experimento, las ratas se habituaron al test. La rutina de habituación consiste en colocar los animales en cada compartimiento durante 180 s (cilindro de inicio y caja de escape). Un AT consiste en colocar una rata en el cilindro de inicio, ubicado en el centro de la plataforma durante 30 s; el cilindro se eleva, los estímulos aversivos (luz y ruido intensos) se encienden y la rata explora libremente el laberinto durante 120 s. El objetivo de los ATs es entrenar a los animales para encontrar el agujero de escape. Un PT es similar a un AT, excepto que se elimina la caja de escape; su propósito es evaluar la retención de la memoria espacial. Durante el PT, las ratas exploran el laberinto durante 120 s. Las superficies del laberinto, el cilindro de inicio y la caja de escape se limpian con etanol al 10 % después de cada prueba para eliminar las señales olfativas. El día anterior a los ATs, los animales se habituaron a la cámara de inicio y a la caja de escape, colocándolos dentro de cada uno durante 180 s. El comportamiento se registró utilizando una cámara de video montada a 110 cm por encima de la plataforma, conectada a una computadora. El rendimiento de cada animal se determinó utilizando el software Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>). Los parámetros de comportamiento evaluados fueron los siguientes:

- a. Latencia de la caja de escape:* tiempo (en seg) que pasa un animal desde su lanzamiento desde la cámara de inicio hasta que entra en la caja de escape (durante un AT) o hasta la primera exploración del orificio de escape (durante un PT).
- b. Frecuencia de exploración del sector meta (Goal Sector, GS):* la suma del número de exploraciones de los agujeros -1, 0 y 1 dividido por 3 (GS3) o el número de exploraciones del agujero 0 (GS1), durante un PT.
- c. Índice de progresión del GS3:* este parámetro resulta de la diferencia entre la frecuencia de exploración final (post-tratamiento) menos la inicial (pre-tratamiento) para el GS3.

### 3.2.7. Eutanasia y procesamiento de los cerebros

Al final del experimento se procedió a la eutanasia de los animales. La mitad de ellos fueron colocados bajo anestesia profunda con ketamina (40 mg/kg de PC; im) y se procedió a la perfusión intracardiaca. Para acceder al corazón, se efectuó una incisión a la altura del esternón, se cortaron el diafragma y las costillas en la unión costocondral, retirando la región con una tijera diente de ratón. Una vez expuesto el corazón, se canuló la arteria aorta a través del ventrículo izquierdo con una aguja de punta roma (**Figura 18**). Inmediatamente después, se efectuó un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito. Se perfundió a una velocidad de 13 ml/min con una bomba peristáltica (Gilson modelo MP312), primero pasando 200 ml de buffer fosfato (PB, 0,01M) y luego 200 ml de paraformaldehído (PFA) al 4 %, (pH 7,4). Subsecuentemente, los animales se decapitaron con una guillotina, los cerebros se trajeron cuidadosamente y se almacenaron en PFA al 4% durante toda la noche a 4 °C. Luego, los cerebros fueron conservados en solución criopreservadora (30 % de etilenglicol, 1 % de polivinilpirrolidona, 30 % de sacarosa, en PB 0,1 M, pH 7,4) a -20 °C hasta su uso en IHQ. Para ello, se cortaron coronalmente en secciones de 40  $\mu$ m con vibratomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se dividieron en 6 series, cada serie conteniendo una de cada seis secciones. De esta manera se obtiene un conjunto de secciones seriadas no contiguas que abarcaban el hipocampo dorsal (con una separación de 240  $\mu$ m).

El resto de los animales fue rápidamente decapitado y el hipocampo fue disecado cuidadosamente como se describió antes (**Glowinski y Iversen 1966**) y se almacenó a -80 °C hasta el análisis de Western Blot (WB).



**Figura 18. Fijación por perfusión intracardíaca.** Los animales destinados a inmunohistoquímica se perfundieron a través del corazón. La bomba peristáltica impulsa el fijador que ingresa a la circulación del

animal por el ventrículo izquierdo y, luego de bañar los tejidos, emerge por la aurícula derecha. Vista panorámica del sistema de perfusión (**A**). Detalle de la aguja insertada en el ventrículo izquierdo (**B**).

### 3.2.8. Inmunohistoquímica

Todas las técnicas de IHQ se realizaron en secciones con flotación libre. Para cada animal, se procesaron conjuntos separados de secciones usando los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de cabra anti-doblecortina (DCX) (marcador de neuroblastos; dilución 1: 250; Santa Cruz Biotechnology, c-18) y anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 (marcador de células de microglía, dilución 1: 1000; Wako Chemicals, 016-20001). Para la detección, se utilizó el kit ABC universal Vectastain® (1: 500, Vector Laboratories, PK-6100) que emplea 3,3-diamino bencidina tretrahidrocloruro (DAB) como cromógeno. Brevemente, después de la incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, las secciones se incubaron con anticuerpo de burro anti-ratón biotinilado (dilución 1:300; Vector Laboratories, BA-9200) o anti-cabra (dilución 1:300; Vector Laboratories, BA-9500), según corresponda, durante 120 min. Posteriormente, se enjuagó e incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC) durante 90 min y luego se incubó con DAB. Las secciones se colorearon con la tinción Nissl (solución de violeta de cresilo al 0,5 % a 37 °C, durante 10 min) para visualizar los puntos de referencia anatómicos. Finalmente, se deshidrataron y se montaron con Vectamount (Vector Laboratories) y se usaron para el análisis de imágenes.

### 3.2.9. Obtención y análisis de imágenes

Centramos nuestro análisis en el hipocampo dorsal, ubicado entre las coordenadas -2,8 mm y 4,5 mm desde el bregma (**Paxinos y Watson 1998**), utilizando un microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara de video Olympus DP70 CCD (Tokio, Japón). El número total de células se estimó utilizando una versión modificada del método del disector óptico (West 1993). Las estimaciones individuales del número total de células bilaterales (N) se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:  $N = RQ\sum \cdot 1 / ssf \cdot 1 / asf \cdot 1 / tsf$ , donde  $RQ\sum$  es la suma de las células contadas,  $ssf$  es la fracción de muestreo de la sección,  $ASF$  es la fracción de muestreo del área y  $tsf$  es la fracción de muestreo del espesor.

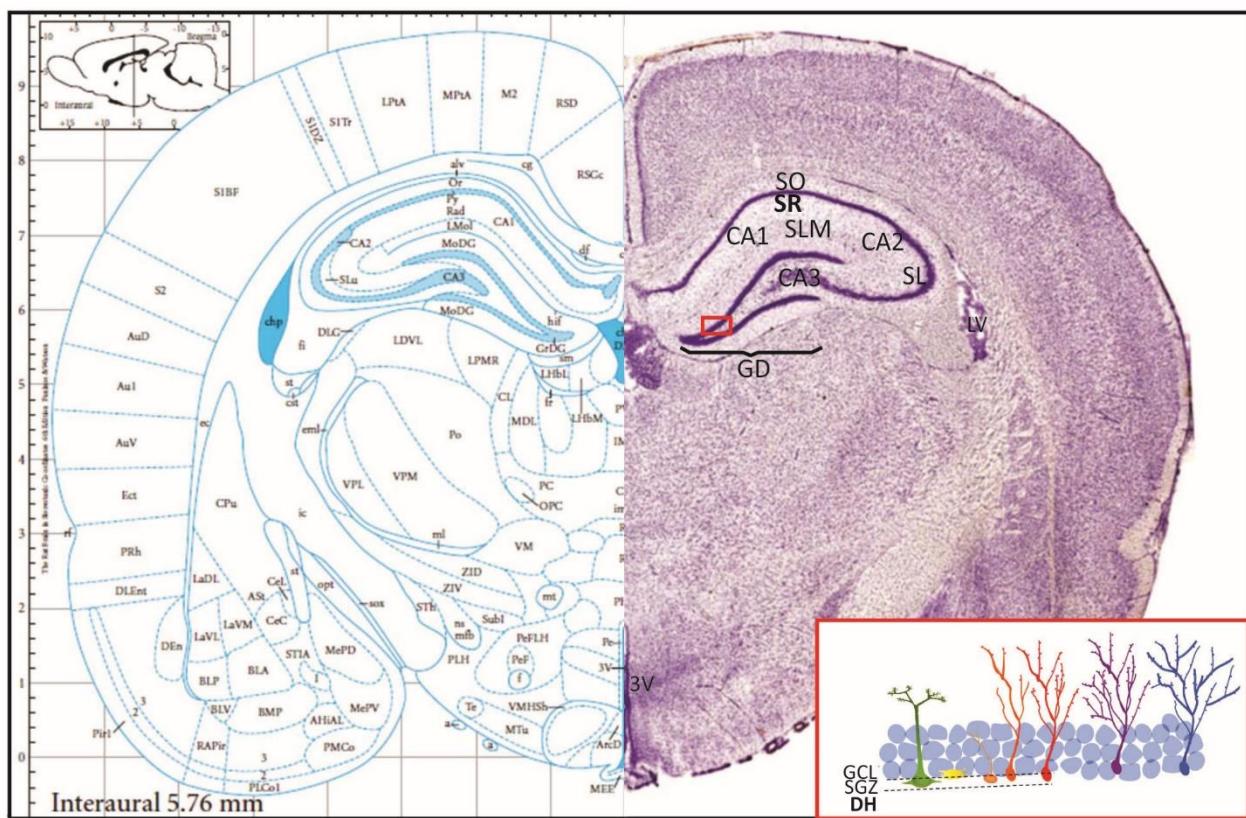
### 3.2.10. Análisis de neuroblastos

El número de neuroblastos positivos para DCX se evaluó mediante la técnica de fraccionador óptico modificada (**West 1993**). Se cuantificaron todas las regiones de la zona subgranular (SGZ) y de la capa

celular granular (GCL) (**Figura 19**) (8 secciones por animal), con asf = 1, ssf = 1/6 y tsf = 1. Las estimaciones se basaron en el conteo de cuerpos celulares DCX(+) a medida que se enfocaban en el microscopio. N = 4 animales por grupo.

### **3.2.11. Análisis de células microgliales**

Las células microgliales se identificaron como células inmunorreactivas Iba-1 (Iba-1ir). Las células Iba-1 ir se contaron en el SR de la región CA1 del hipocampo dorsal. El límite superior SR es la capa piramidal CA1, el límite inferior es *Stratum Lacunosum Moleculare* (SLM) y el límite lateral es el *Stratum Lucidum* (SL) (**Figura 19**) (**Paxinos y Watson 1998**). El número de células Iba-1ir se estimó mediante una versión modificada del método del disector óptico (**Pardo y col. 2016**). Para este fin, se superpuso una cuadrícula (área = 22500  $\mu\text{m}^2$ ) sobre imágenes calibradas tomadas con un aumento de 600 X (3 campos por sección, 6-8 secciones por animal) y se contaron las células dentro dicho área. Las células que hacían contacto con las líneas de los límites inclusión (arriba y a la derecha) de la cuadrícula se incluyeron en el recuento, mientras que las que estaban en contacto con las líneas de los límites de exclusión (abajo y a la izquierda) de no se contaron. Las células Iba-1 se clasificaron morfológicamente como de Tipo I, II, III, IV y V sobre la base de criterios previamente documentados (**Zappa Villar y col. 2018; Diz-Chaves y col. 2012**). Tipo I, células con pocos procesos celulares ( $\leq 2$ ); Tipo II, células que muestran de tres a cinco ramas cortas; Tipo III, células con procesos celulares más largos y numerosos ( $> 5$ ) y un cuerpo celular pequeño; Tipo IV, células con somas grandes y procesos retraídos y más gruesos y; Tipo V, células con cuerpo celular ameboide, numerosos procesos cortos e inmunomarcación Iba-1 intensa. Los tipos I, II y III se clasificaron como microglía no reactiva, mientras que los tipos IV y V se consideraron como microglía reactiva. Para cada animal se calculó el número de células microgliales reactivas / sección con asf = 0,387, ssf = 1/6 y tsf = 1. N = 4 animales por grupo.



**Figura 19. Corte coronal del cerebro de rata.** Hemisferio izquierdo correspondiente al Atlas Paxinos mostrando el hipocampo dorsal. Hemisferio derecho con tinción Nissl. Recuadro: sección ampliada del giro dentado mostrando las diferentes regiones celulares. Abreviaturas: CA1, *Cornu Ammonis* 1; CA2, *Cornu Ammonis* 2; CA3, *Cornu Ammonis* 3; GD, giro dentado; DH, *Dentate Hilus*; GCL, capa celular granular; SLM, *Stratum Lacunosum Moleculare*; SGZ, zona subgranular; SO, *Stratum Oriens*; SR, *Stratum Radiatum*; VL, ventrículo laterale; 3V, tercer ventrículo.

### 3.2.12. Análisis de Western Blot

#### 3.2.12.1 Preparación de las muestras

Para obtener lisados de proteínas, se homogeneizaron los hipocampos con buffer RIPA pre-enfriado (NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, SDS al 0,1 %, Tris-HCl 50 mM, pH 8 e inhibidores de proteasas apropiados, pH 7,4). Finalmente, las concentraciones de proteínas se midieron mediante el ensayo Bradford. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) (0,1-1 mg/ml) como estándar. Las muestras se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

#### 3.2.12.2 Inmunotransferencia

Para cada muestra, se separaron cantidades iguales de proteína (50 µg) mediante SDS-PAGE 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon mediante

incubación en leche vacuna descremada al 5 % en solución buffer salina con Tris/Tween-20 (TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente y, luego, se incubaron con anticuerpos primarios contra sinaptotagmina 1 (SYT1, 1:200; mAb 48 (asv 48), DSHB), sinaptofisina (SYP, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-17750), y vinculina (VIN, 1: 200; Santa Cruz Biotechnology, sc-73614) durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (dilución 1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-003), conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Horse Radish Peroxidase) durante 3 hs a temperatura ambiente. Despues del lavado con TBS-T, se realizó la visualización de la membrana con el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, 34577,) en un equipo de imágenes Chemidoc (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). La densidad óptica relativa de las bandas de proteína se analizó utilizando el software ImageJ. Las cargas de las muestras se normalizaron a la densidad relativa de la banda de VIN. N = 4 animales por grupo.

### **3.2.13. Análisis estadístico**

Los datos se compilaron y analizaron con el software Sigma Plot v. 11 (San Jose, CA). El análisis ANOVA con mediciones repetidas (MR) se aplicó en los datos obtenidos del BM. El test de pares coincidentes de Wilcoxon se empleó para el análisis de GS3. Para IHQ de Iba-1 y la inmunotransferencia de SYT1, se utilizó el análisis ANOVA. Para los demás estudios, la evaluación estereológica de los datos de los grupos seniles se examinó mediante el test-t de Student no pareado. Todos los datos se representan como media ± error estándar de la media (SEM). Se usaron pruebas post-hoc cuando fue apropiado (Holm-Sidak y Tukey). P < 0,05 fue establecido como significativo.

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Estudio temporal de las MSCs en los ventrículos cerebrales**

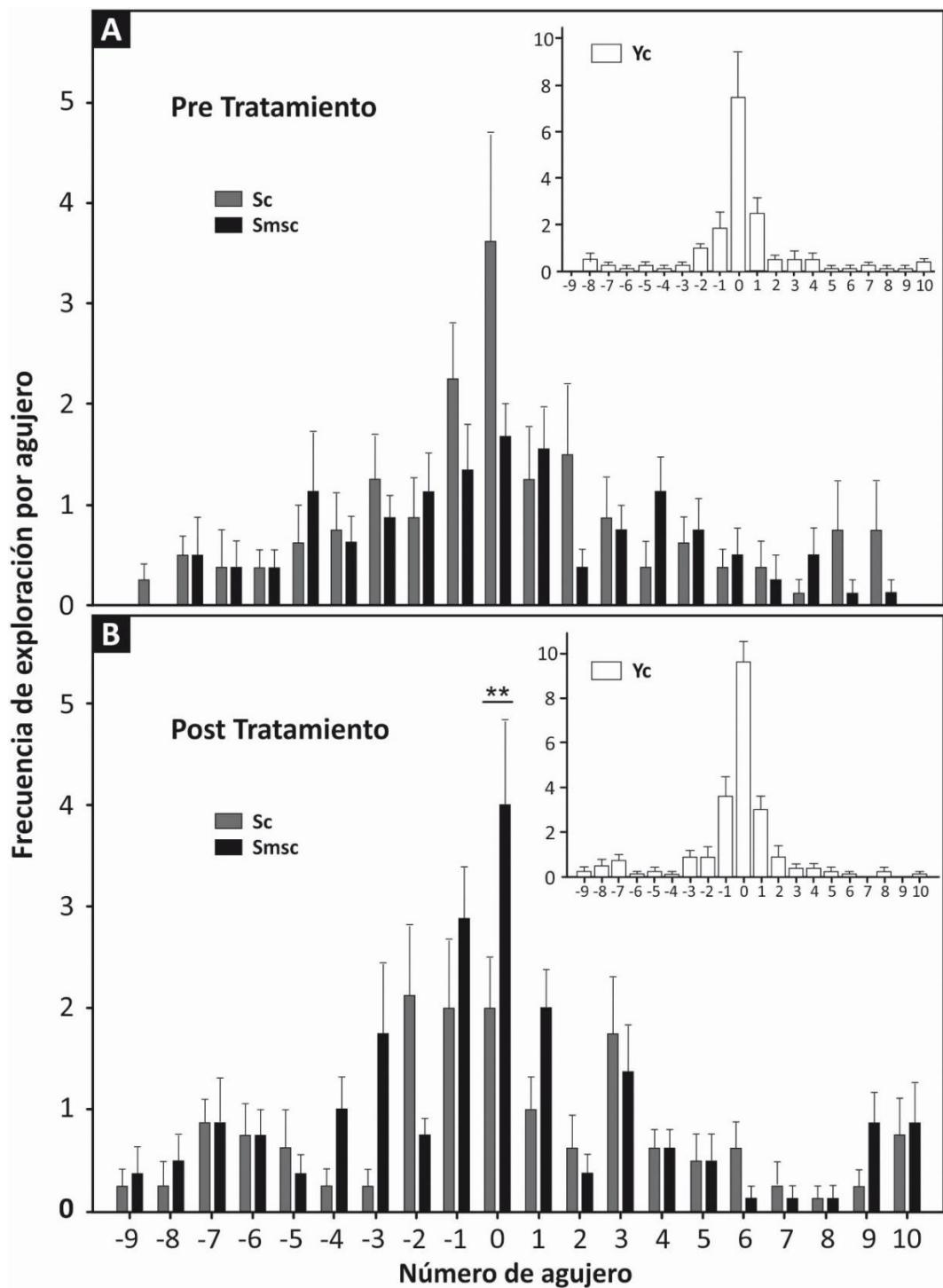
La fluorescencia del Dil en cortes coronales de cerebros jóvenes inyectados con MSCs reveló que cinco días después de la inyección, las hBM-MSC marcadas con Dil se ubicaron en contacto cercano con las células ependimarias. La fluorescencia disminuyó progresivamente a partir del DEx 5. En el día del sacrificio (DEx 21), las MSCs marcadas todavía podían observarse cerca de las capas

ependimarias. Sin embargo, algunas de estas células viajaron una corta distancia desde los espacios ventriculares hasta el parénquima (**Figura 17**).

### **3.3.2 Efecto del tratamiento con MSCs en la cognición de las ratas seniles**

#### **3.3.2.1 Frecuencia de exploración por agujero**

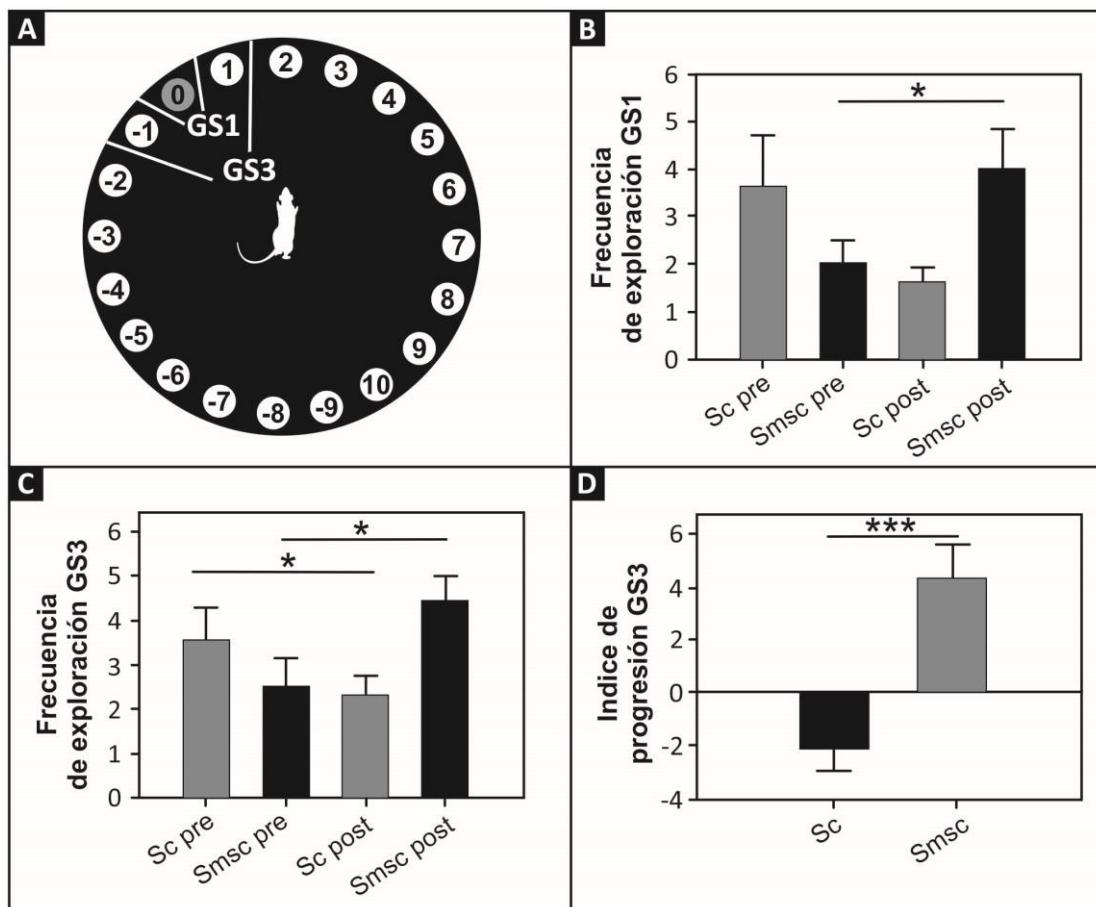
Como se esperaba, la frecuencia de exploración por agujero mostró una distribución en forma de campana alrededor del agujero meta en el PT, para los tres grupos experimentales, antes y después del tratamiento (**Figura 20.A-B**). Sin embargo, dicha distribución estaba menos definida en ratas viejas que en ratas jóvenes. La forma de la campana fue más aguda en los animales jóvenes (**recuadro Figura 20.A-B**). En el pre-tratamiento, la forma y la amplitud de la frecuencia de exploración por agujero fueron comparables entre los grupos Sc y SmSC (ANOVA MR de dos vías,  $P = 0,1$ ), y la frecuencia de exploración del agujero 0 fue significativamente diferente al resto de los orificios en ambos grupos seniles (ANOVA MR de dos vías,  $P < 0,0001$ ) (**Figura 20.A**). En el post-tratamiento, la forma y la amplitud de la frecuencia de exploración por agujero fueron significativamente diferentes entre los grupos Sc y SmSC (ANOVA MR de dos vías,  $P = 0,045$ ), con una preferencia mayor por los agujeros vecinos al meta que por aquellos alejados del GS (**Figura 20.B**. Factor agujero ANOVA MR de dos vías,  $P < 0,0001$ ). Puede observarse para el grupo SmSC que la frecuencia de exploración del agujero 0 fue significativamente mayor que en las ratas Sc (test Sidak de comparaciones múltiples versus el grupo de control,  $P < 0,01$ ). Además, existe una interacción estadísticamente significativa entre el tratamiento y la posición del agujero (ANOVA MR tratamiento bidireccional interacción por agujero,  $P = 0,008$ ).



**Figura 20. Efecto de la terapia MSCs en la frecuencia de exploración por agujero.** En el pre-tratamiento (A), Sc y Smsc mostraron una frecuencia exploratoria similar alrededor del agujero 0. Después del tratamiento (B), la frecuencia de exploración en el agujero 0 fue significativamente mayor para Smsc que para Sc. La frecuencia de exploración en cada uno de los agujeros restantes permaneció similar para Smsc versus Sc. Los recuadros muestran la frecuencia de exploración para Yc. Se observa que la frecuencia de exploración de todos los agujeros en ratas jóvenes es 2,5 veces mayor alrededor del agujero meta que en las contrapartes seniles. N = 8 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. \* P < 0,05 versus el agujero Sc correspondiente.

### 3.3.2.2. Exploración del sector meta

Se evaluó y comparó la frecuencia de exploración por agujero de las ratas seniles antes y después del tratamiento MSCs en los diferentes GS (Figura 21.A). En el GS1, las ratas Sc no mostraron diferencias significativas antes y después del DEx 0 (test-t pareado,  $P = 0,116$ ), mientras que la terapia MSCs indujo un aumento significativo en la exploración del GS1 (test-t pareado,  $P = 0,016$ ) (Figura 21.B). En el GS3, la frecuencia de exploración de ambos grupos de ratas seniles mostró una diferencia significativa antes y después del DE 0 (test de pares coincidentes de Wilcoxon,  $P = 0,016$ ). En las ratas Smsc, el tratamiento indujo un aumento significativo en la frecuencia de exploración del GS3 (test-t pareado,  $P = 0,015$ ) (Figura 21.C). Cuando se comparó la progresión en la frecuencia exploratoria GS3 (post-tratamiento - pre-tratamiento), las ratas Smsc presentaron una mejoría en este parámetro, pero el grupo Sc mostró un comportamiento deficiente (test-t pareado,  $P = 0,001$ ) (Figura 21.D).



**Figura 21. Efecto de la terapia de MSCs en la frecuencia de exploración del sector meta.** Representación esquemática de los sectores meta (GS1 y GS3) en el Laberinto de Barnes (A). Frecuencia exploratoria en GS1 (B); en el post-tratamiento, Sc no mostró cambios significativos mientras que Smsc aumentó significativamente la exploración del agujero meta. Frecuencia exploratoria en GS3 (C); Sc y Smsc mostraron cambios significativos en el post-tratamiento, con una disminución para Sc y un aumento notable para Smsc.

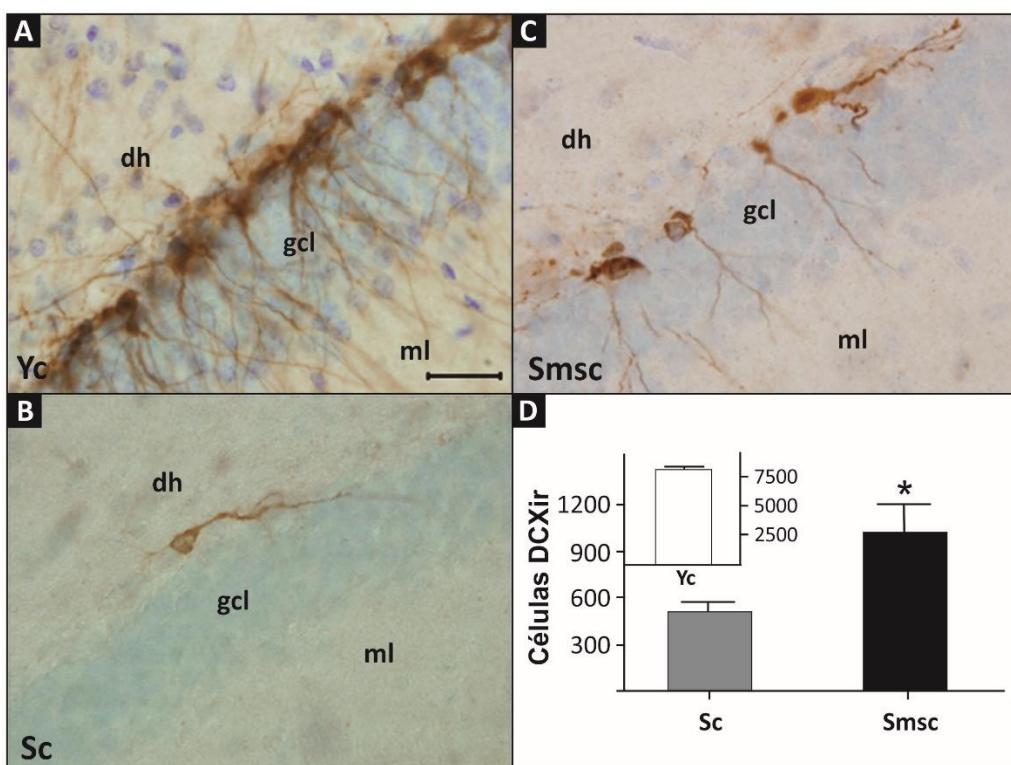
Progresión en la frecuencia exploratoria en GS3 (**D**); se observó una progresión negativa en el grupo Sc y una progresión positiva en Smsc. Abreviaturas: GS, sector meta. N = 8 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. \* P < 0,05: \*\*\*, P < 0,001.

### 3.3.3 Efecto del tratamiento con MSCs en el hipocampo de ratas seniles

#### 3.3.3.1 Cambios morfométricos

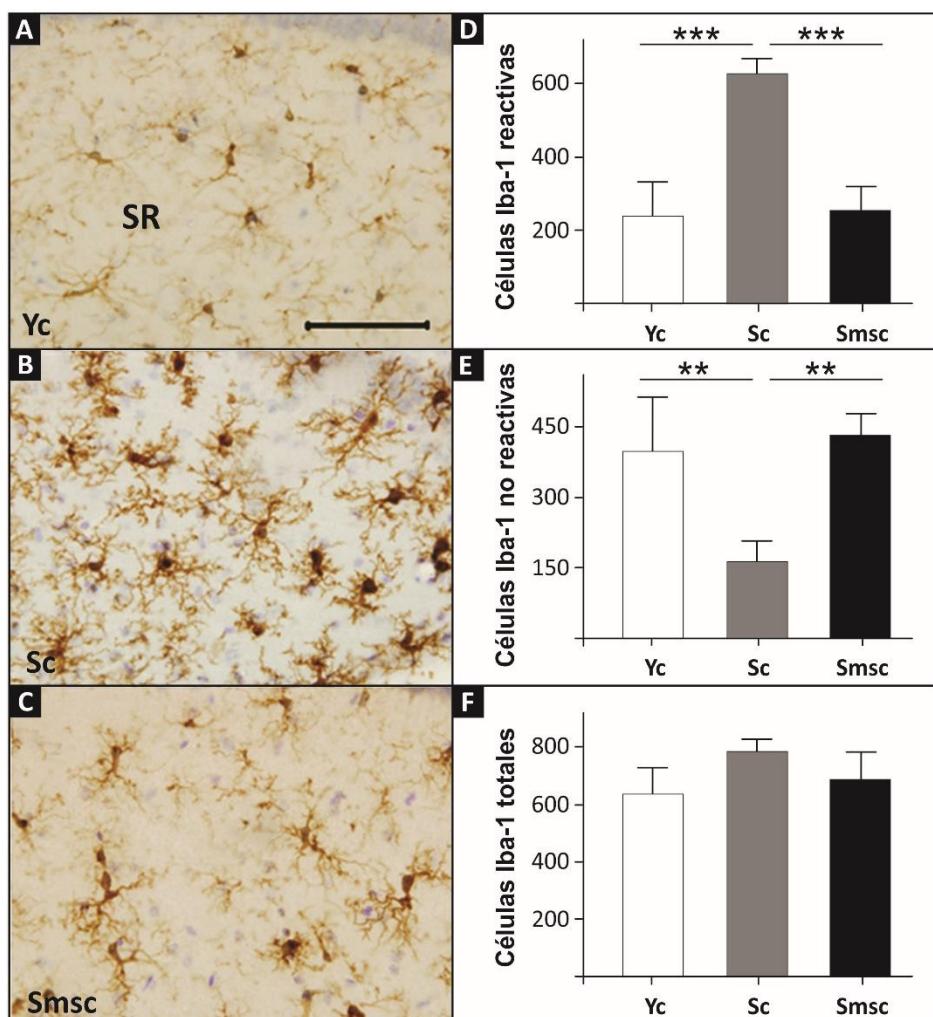
Se realizó una evaluación estereológica de neuroblastos y células microgliales en el hipocampo dorsal de ratas controles jóvenes y seniles, así como en ratas seniles tratadas con MSCs.

Respecto a la inmunomarcación para evaluar neurogénesis en el GD (**Figura 22.A-C**), se detectó un aumento significativo en el número de células DCX (neuroblastos) en ratas seniles controles versus tratadas con MSCs (Test-t pareado no pareada, P = 0,042). Como se esperaba, el número de neuronas DCX en la misma región fue mucho mayor en ratas jóvenes que en ratas viejas (**Figura 22.D**).



**Figura 22: Expresión de doblecortina (DCX) en el giro dentado (GD) de ratas jóvenes intactas (Yc), seniles intactas (Sc) y seniles + MSCs (Smsc).** Secciones coronales del GD en animales representativos de cada grupo que muestran las neuronas DCX (**A-C**). Cuantificación de células DCXir en el GD de ratas seniles (**D**). El recuadro muestra el número de células DCXir en la misma región del hipocampo de ratas Yc. Abreviaturas: *dh*, dentate hilus; *gcl*, capa celular granular; *ml*, capa molecular; *DCXir*, DCX inmunorreactiva. N = 4 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Se hicieron comparaciones entre grupos seniles, \* P < 0,05. Barra de escala 25  $\mu$ m.

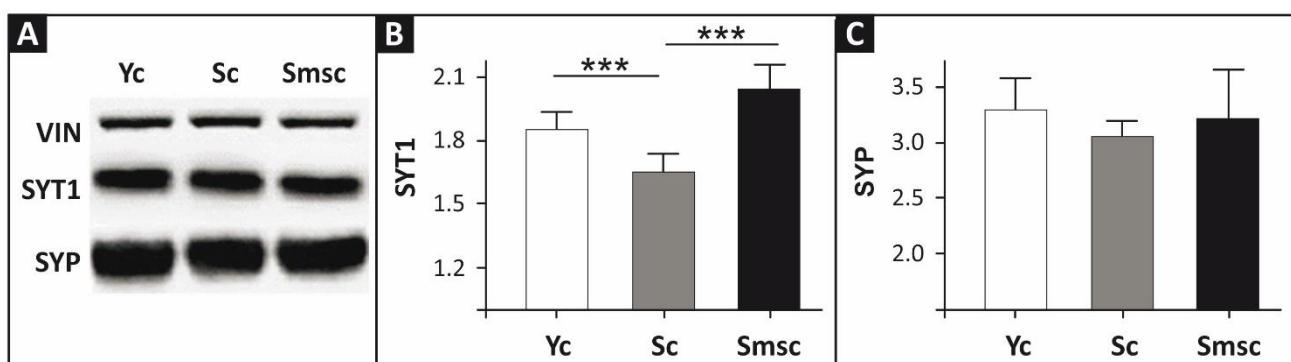
Las células microgliales Iba-1ir del SR hipocampal (**Figura 23.A-C**) fueron cuantificadas y clasificadas como reactivas y no reactivas. Como se esperaba, el número de células microgliales reactivas aumentó en las ratas seniles pero el tratamiento MSCs indujo una disminución significativa de este parámetro (**Figura 23.D**. ANOVA de una vía,  $P = 0,075$ ). El número de células microgliales no reactivas en las ratas seniles MSCs aumentó significativamente en comparación con los controles seniles (**Figura 23.E**. ANOVA de una vía,  $P = 0,002$ ). El tratamiento MSCs no indujo cambios significativos en las células Iba-1 totales (**Figura 23.F**. ANOVA de una vía,  $P = 0,076$ ).



**Figura 23. Células Iba-1 en el hipocampo de ratas seniles tratadas con MSCs.** Cortes coronales del hipocampo dorsal en animales representativos de cada grupo que muestran células Iba-1ir. Las microfotografías de la izquierda de los grupos Yc (A), Sc (B) y Smsc (C) muestran células Iba-1ir en el SR. Los gráficos de la derecha muestran la cuantificación de la microglía reactiva (D), no reactivo (E) y total (F) en el SR de Yc, Sc y Smsc. Abreviaturas: *Iba-1ir*, Iba-1 inmunorreactivas; *SR*, *Stratum Radiatum*. N = 4 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Se hicieron comparaciones con el grupo Sc, \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3.2 Cambios en proteínas presinápticas

Con el fin de explorar el efecto de las MSCs en las sinapsis del hipocampo senil, se determinaron los niveles de dos proteínas presinápticas mediante análisis de WB. Ni la edad ni el tratamiento indujeron cambios en los niveles de SYP, una proteína pequeña de vesículas presinápticas que contienen neurotransmisores (**Wiedenmann y Franke 1985**) (**Figura 24.C**. ANOVA de una vía,  $P = 0,588$ ). Sin embargo, SYT1, una proteína de membrana asociada a las vesículas presinápticas que actúa como sensor de calcio para la liberación rápida de neurotransmisores desde terminales nerviosos presinápticos (**Fox y Sanes 2007**), mostró una disminución significativa en ratas seniles (**Figura 24.B**. ANOVA de una vía,  $P = 0,001$ ).



**Figura 24. Efecto de la terapia MSCs en los niveles de proteínas hippociales de rata.** Imágenes representativas de los niveles de las proteínas VIN, SYT1 y SYP en el hipocampo de cada grupo experimental (A). Cuantificación de los niveles de proteína de SYT1 (B) y SYP (C), normalizados a la densidad relativa de VIN. Se observó una disminución significativa en los niveles de proteína SYT1 en las ratas Sc, mientras que la terapia celular condujo a una recuperación del nivel de SYT1 en las ratas Smsc. Los niveles de proteína SYP tienden a disminuir en el grupo Sc, pero no se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales. Abreviaturas: VIN, Vinculina; SYT1, sinaptotagmina 1; SYP, sinaptofisina.  $N = 4$  por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Se realizaron comparaciones entre grupos, \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

## 3.4 Discusión

Estudios previos han demostrado que inyecciones iv crónicas de hMSCs derivadas de membrana amniótica o de tejido adiposo prolongan la vida en ratas macho *Fisher F344* de 10 meses de edad, en un 23 y un 31 %, respectivamente. Dichas hMSCs mejoraron las funciones cognitivas y físicas de las ratas *Fisher* envejecidas naturalmente (**Kim y col. 2015**). Los hallazgos anteriores, junto con resultados de otros autores (**Shen y col. 2011**) y de nuestro grupo sugieren que las MSCs poseen la capacidad de retardar la declinación relacionada con la edad, típica de especies animales superiores, cuando el tratamiento se inicia durante la edad adulta. De este modo, en nuestro laboratorio se ha

demostrado que la inyección iv crónica de hMSCs en una rata a partir de los 6 meses de edad, prolonga notablemente (22 %) su vida (44 meses de vida máxima frente a los 36 meses promedio, típicos de ratas de laboratorio estándar) (**Mansilla y col. 2016; Warmack y col. 2016**). En el presente estudio, centramos nuestro trabajo en el efecto del tratamiento con MSCs sobre ratas envejecidas, en un intento por determinar si la administración de hBM-MSCs en ratas seniles podría restaurar su rendimiento cognitivo deficiente y la morfología alterada del hipocampo.

Elegimos la vía de administración ependimaria para evitar la pérdida de MSCs en compartimentos extraneurales, como el hígado y los pulmones. Dado que los resultados del estudio temporal post-inyección icv revelan un número cada vez menor de MSCs con el transcurso de los días, parecería que las MSCs inyectadas tienen un tiempo de permanencia limitado en los espacios cerebroventriculares de animales viejos. El modesto número de células Dil(+) observado en el parénquima cerebral de nuestras ratas seniles difiere de los hallazgos documentados en ratas jóvenes inyectadas con MSCs (**Tfilin y col. 2010**). En ese estudio, después del trasplante, las MSCs migraron principalmente a las regiones ipsilaterales de CA1 y CA3 y GD del hipocampo y, en menor medida, a otras regiones del cerebro. Los autores utilizaron MSCs derivadas de médula ósea de ratas pertenecientes a un modelo genético de depresión (FSL), mientras que en nuestro estudio se utilizaron las MSCs derivadas de médula ósea humana, diferencia que podría explicar el contraste observado en la migración.

Con respecto al efecto de las hBM-MSCs en el comportamiento, nuestros resultados en ratas seniles muestran una mejora inducida por el tratamiento en la precisión para ubicar el sector meta en el test BM, en línea con la evidencia de mejora cognitiva documentada en modelos de neurodegeneración en roedores. En este contexto, se ha informado que la administración intrahipocampal de MSCs derivadas de sangre de cordón umbilical humano (hUC-MSCs) en un modelo de EA en ratón, restableció parcialmente el rendimiento cognitivo evaluado mediante el test MWM (**Lee y col. 2010**). Además, en el estudio en ratas FSL mencionado previamente, se inyectaron MSCs de rata ( $10^5$  células/ bilateralmente) en los VL y 12 días después, se evaluaron los animales mediante el test de nado forzado (FS); los resultados revelaron que las ratas FSL trasplantadas con MSCs tuvieron una mejora significativa en su comportamiento (**Tfilin y col. 2010**).

Nuestra observación de que el tratamiento con MSCs incrementa significativamente el número de neuronas DCX en el GD de las ratas seniles sugiere un aumento leve pero significativo en la neurogénesis o en la vida media de los neuroblastos en esta región. En efecto, se ha informado que

las hMSCs implantadas en el GD del hipocampo de ratones inmunodeficientes, promueven la neurogénesis (**Munoz y col. 2005**). En el estudio de Tfilin y col, 2010, citado anteriormente, los autores observaron que después de la administración de MSCs-icv, aumentó la neurogénesis en el GD hipocampal ipsilateral y se correlacionó con el comportamiento en las ratas tratadas (**Tfilin y col. 2010**).

Al momento de explorar los mecanismos por los cuales las MSCs mejoran las lesiones del SNC, la premisa inicial fue su migración a los tejidos lesionados y posterior transdiferenciación para reemplazar las células neurales dañadas (**Kopen, Prockop y Phinney 1999; Qu y col. 2008**). Sin embargo, estudios más recientes demostraron que las MSCs trasplantadas ejercen su efecto terapéutico sin evidencia de implante (**Lee y col. 2009; Janowski, Wagner y Boltze 2015; Wang y col. 2012**), lo que indica que sus capacidades regenerativas y diferenciadoras pueden no desempeñar un papel relevante en la reparación del tejido.

Además, se sabe que cuando son estimuladas por señales inflamatorias, las MSCs secretan una variedad de moléculas bioactivas, como factores tróficos y moléculas antiinflamatorias capaces de modular el microambiente del huésped (**Scuteri y col. 2011**), constituyendo probablemente el principal mecanismo responsable de sus efectos terapéuticos cuando se administran por vía icv o iv (**Meirelles y col. 2009**). Es posible que algunos de los factores neurotróficos responsables de estos efectos provengan de las propias MSCs, tal como lo sugiere un estudio en el que el análisis de una biblioteca de ADNc de MSCs humanas reveló la expresión de transcriptos que codifican BDNF y factor neurotrófico beta del sistema nervioso ( $\beta$ -NGF). Además, la inmunotinción demostró que las proteínas BDNF y  $\beta$ -NGF estaban restringidas a subpoblaciones específicas de MSCs, lo que se confirmó mediante el análisis ELISA de 56 subclones separados de hMSCs (**Crigler y col. 2006**). Por lo tanto, existe la posibilidad de que los factores neurogénicos liberados por nuestras hBM-MSCs en el espacio cerebroventricular alcancen las células del hipocampo, induciendo una mejora moderada en la función y la estructura hipocampal.

La reactividad inmune y los procesos inflamatorios aumentan en el cerebro con el envejecimiento (**Lucin y Wyss-Coray 2009**), y la microglía desempeña un papel central en esta desregulación (**Luo, Ding y Chen 2010; Norden y Godbout 2013**). La inmunidad innata dentro del SNC se origina principalmente en la microglía residente, células cerebrales esenciales en la vigilancia inmunológica y en mediar respuestas coordinadas entre el sistema inmune y el cerebro. Con el envejecimiento

normal, la microglía desarrolla un fenotipo más reactivo. También hay diferencias importantes en la biología microglial entre la juventud y la vejez cuando el sistema inmunológico es desafiado y la microglía activada. En este contexto, la activación microglial se amplifica y se prolonga en el cerebro envejecido en comparación con los cerebros adultos. La prolongada activación microglial conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias que exacerbaban la neuroinflamación, lo cual contribuye a la pérdida neuronal y al deterioro de la función cognitiva (**Luo, Ding y Chen 2010; Norden y Godbout 2013**).

Como se esperaba, el número de células microgliales reactivas en el SR de nuestras ratas seniles fue significativamente mayor que en los controles jóvenes; sin embargo, después del tratamiento con hBM-MSC, la cantidad de células microgliales reactivas en el SR de ratas seniles revirtió a los niveles de los animales jóvenes. Esto se condice con la evidencia de que las MSCs derivadas de médula ósea mantienen el fenotipo en reposo de la microglía e inhiben la activación microglial a través de la producción de varios factores (**Yan y col. 2013**). Por otra parte, ni el envejecimiento ni el tratamiento con MSCs parecieron modificar el número total de células microgliales en el SR de nuestras ratas.

Además, debe señalarse que hay cada vez más evidencia que respalda el papel relevante de la microglía en la remodelación de los circuitos sinápticos (**Weinhard y col. 2018; Paolicelli y col. 2011; Schafer y col. 2012; Sipe y col. 2016; Tremblay, Lowery y Majewska 2010**). En particular, se observó que la microglía modula las sinapsis mediante la eliminación de componentes presinápticos (**Weinhard y col. 2018; Schafer y col. 2012**). El presente estudio reveló una expresión diferencial de la proteína presináptica SYT1 en el hipocampo de ratas seniles. Resulta de interés que el trasplante único de MSCs en estos animales restauró los niveles de SYT1 a valores de animales jóvenes. Esta observación está en línea con un estudio en un modelo de envejecimiento convencional en ratones en el que las hUC-MSCs mejoraron notablemente la plasticidad sináptica en el área CA1 del hipocampo envejecido (**Cao y col. 2017**).

## **CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO *IN VIVO* DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS (Objetivo específico 2)**

### **4.1 Reseña Introductoria**

La EAE es la forma más frecuente de demencia, por lo que existe una creciente necesidad de un modelo experimental que permita recapitular las marcas patológicas de la enfermedad. Respecto a esto, la inyección de STZ-icv en ratas constituye un modelo promisorio, ya que los animales desarrollan un estado cerebral insulino-resistente junto con déficits cognitivos. Si bien una importante cantidad de estudios han caracterizado a este modelo de EAE, nuevos estudios morfológicos y de comportamiento son necesarios para una validación y aceptación completa.

En el presente capítulo, caracterizamos los efectos de la inyección de STZ-icv a corto plazo tanto en el comportamiento como en la morfometría del hipocampo, luego de la exposición a dosis bajas y altas de STZ.

### **4.2 Materiales y métodos**

#### **4.2.1 Animales**

Se utilizaron ratas macho SD de tres meses de edad, con un peso de 280-330 g (INIBIOLP, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).

Se alojaron 3 animales por jaula en una habitación de bioriego con temperatura controlada (22-24 °C), ciclos de 12 hs de luz / 12 hs de oscuridad (luces de 7 am a 7 pm), con alimento y agua disponibles a voluntad.

Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con las guías de bienestar animal del NIH (A5647-01). La aceptabilidad ética de nuestros protocolos animales fue aprobada por el CICUAL de la FCM, UNLP (T10-01-2013).

#### **4.2.2 Procedimientos quirúrgicos**

Las ratas recibieron analgesia con tramadol (10 mg/kg de PC, ip), luego fueron anestesiadas con clorhidrato de ketamina (40 mg/kg de PC, ip) y xilacina (8 mg/kg de PC, im) y se situaron en un aparato estereotáxico. Se colocaron cánulas guía de acero inoxidable (aguja de calibre 21) dirigidas hacia los VL. Las coordenadas estereotáxicas para la infusión icv se midieron como 0,92 mm posterior a

bregma; 1,5 mm lateral a la sutura sagital y 3.9 mm por debajo de la superficie del cerebro (**Paxinos y Watson 1998**). Las cánulas se fijaron al cráneo con cemento dental. Después de la cirugía, se inyectó una única dosis de ampicilina. Después del experimento, se confirmó la ubicación de las cánulas en los VL.

#### 4.2.3 Evaluación de la memoria espacial

El protocolo del BM utilizado aquí fue previamente descripto en la **sección 3.2.5 (Figura 27)**. Los parámetros de comportamiento evaluados fueron los siguientes:

- a. Latencia:** Tiempo (en s) que demora un animal desde la cámara de inicio hasta que ingresa a la caja de escape (durante un AT), o hasta la primera exploración del agujero de escape (durante un PT).
- b. Errores:** Número de exploraciones en agujeros diferentes al de escape desde el cilindro de inicio hasta que ingresa a la caja de escape (durante un AT), o hasta la primera exploración del orificio de escape (durante un PT). Cada exploración de un agujero incorrecto se cuenta como un error, siempre que la rata baje la nariz por debajo del plano de la superficie de la mesa.
- c. Frecuencia de exploración total:** suma del número total de exploraciones en cada agujero del laberinto, durante un PT.
- d. Frecuencia de exploración en el GS:** suma del número de exploraciones para los agujeros -1, 0 y 1 divididos por 3, durante un PT.
- e. Estrategias de búsqueda (Pompl y col. 1999):** las estrategias de búsqueda se clasificaron como directa, serial y aleatoria según lo descrito por Barnes (**Barnes 1979**). En resumen, en la estrategia directa el animal se mueve desde el centro del laberinto directamente hacia el agujero de escape, sin visitar los agujeros a más de dos orificios de distancia del de escape; en la estrategia serial, el animal se mueve alrededor del borde del laberinto pasando por al menos tres agujeros adyacentes; en la estrategia aleatoria, el animal realiza una búsqueda no sistemática con múltiples cruces a través del centro del laberinto. A la estrategia general para una rata se le asignó uno de los siguientes puntajes: directa = 1, serial = 2 y aleatoria = 3, y esta puntuación se evaluó cada 2 días de adquisición. La estrategia de búsqueda se analizó utilizando el porcentaje de ensayos en el que se utilizó cada estrategia y se evaluó cada dos días de adquisición (2 días / evaluación).

#### 4.2.4 Evaluación de la memoria de reconocimiento

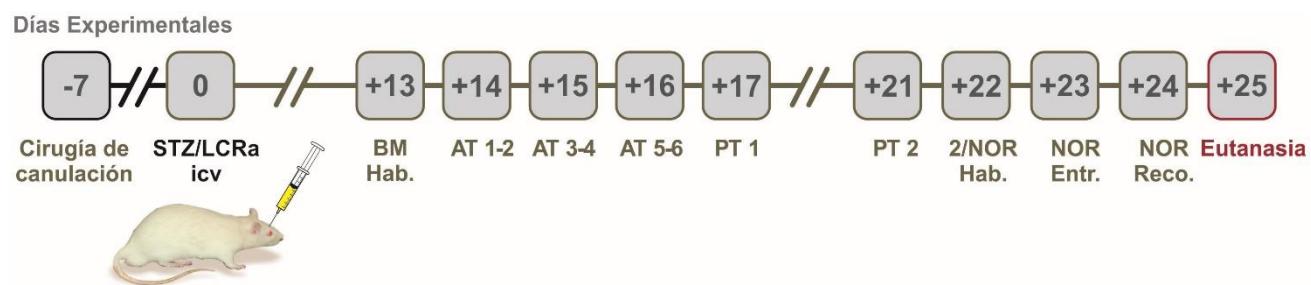
El test NOR se basa en la capacidad de las ratas para mostrar preferencia por objetos novedosos. En el día 1, las ratas se habituaron individualmente (120 s) a una arena abierta (caja cuadrada, 65 x 65 x 45 cm). En el día 2, se realizó la sesión de entrenamiento (120 s), en la cual las ratas se colocaron en la arena junto con dos objetos idénticos (OF1 y OF2). En el día 3, se realizó la sesión de reconocimiento (120 s), donde las ratas se colocaron nuevamente en la misma arena, en la que uno de los objetos fue reemplazado por un objeto nuevo (ON) de dimensiones similares, pero con una forma y color diferente. El comportamiento de exploración se evaluó mediante la cuantificación del tiempo dedicado a la exploración de cada objeto (**Nanfaro y col. 2010**).

La exploración se definió como la orientación del hocico del animal hacia el objeto, dentro de un rango de 2 cm o menos desde el objeto. Los objetos, las paredes y el piso se limpiaron cuidadosamente con etanol (10 %) después de cada prueba individual para eliminar las señales olfativas. El comportamiento se registró mediante una cámara de video conectada a una computadora. El desempeño de cada animal se determinó utilizando el software Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>). Las mediciones de prueba NOR fueron las siguientes: **a. Tiempo de exploración total de los dos objetos idénticos en la sesión de entrenamiento, y b. Tiempo de exploración total del objeto novedoso en la sesión de reconocimiento**. La discriminación entre el objeto familiar y el novedoso durante la sesión de reconocimiento se midió comparando el tiempo dedicado a la exploración del objeto novedoso versus objeto familiar.

#### 4.2.5 Diseño experimental

Una semana antes de la inyección de STZ, se implantó icv una cánula en todos los animales. Luego, en el DEx 0, dieciocho animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de seis animales cada uno: I-Sham, cada rata recibió bilateralmente 5  $\mu$ l de LCR artificial (LCRa) (NaCl 120 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,15 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 27 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,33 mM, ajustado a pH 7,4); II-STZ1, cada rata recibió una inyección icv bilateral de STZ (Sigma-Aldrich, CAS 18883-66-4) 1 mg/kg; III-STZ3, cada rata recibió una inyección icv bilateral de STZ 3 mg/kg. La concentración del fármaco se ajustó de acuerdo con el PC de cada animal, y se administró un volumen de 5  $\mu$ l/ventrículo usando una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l dentro de las cánulas. Se registraron los pesos corporales cada 48 hs durante todo el experimento. En el DEx 13, las ratas se sometieron al protocolo del BM durante 9 días, un día de habituación seguido de 3 días con dos AT diarios. Veinticuatro horas después del

último AT (AT6), en el DEx 17, las ratas se sometieron a un PT (PT1). Con el fin de evaluar el rendimiento cognitivo en el tiempo, 4 días después del PT1, las ratas se sometieron a un segundo PT (PT2). Para el protocolo del test NOR, las ratas se habituaron individualmente a la arena abierta en el DEx 22. Al día siguiente, se realizó la sesión de entrenamiento y, después de 24 hs, se llevó a cabo la sesión de reconocimiento. El último día (DEx 25) se procedió a la eutanasia de todas las ratas mediante rápida decapitación (**Figura 25**).



**Figura 25. Diseño experimental y estudio temporal del peso corporal.** El DEx -7 se colocaron cánulas de acero inoxidable en los ventrículos laterales de las ratas. En el DEx 0, se inyectó STZ o LCRa estereotáxicamente. La habituación al test BM se realizó el DEx +13. Posteriormente, desde el DEx +14 al DEx +16, todos los animales se sometieron a dos AT diarios de 120 s. El PT1 y el PT2 se realizaron los DEx +17 y +21, respectivamente. Los DEx +22 y +24, se realizó el test NOR. Finalmente, el DEx +25, se realizó la eutanasia de las ratas y los cerebros conservaron para los análisis posteriores. Abreviaturas: AT, ensayo de adquisición; BM, laberinto de Barnes; DEx, día experimental; Entr, sesión de entrenamiento; Reco, sesión de reconocimiento; Hab, habituación; LCRa, líquido cefalorraquídeo artificial; NOR, test de reconocimiento del objeto nuevo; PT, ensayo de prueba.

#### 4.2.6 Procesamiento de los cerebros

Los cerebros fueron removidos rápidamente y se dividieron en hemisferios derecho e izquierdo. Los hemisferios izquierdos se fijaron en PFA al 4 % (pH 7,4) durante toda una noche a 4 °C. Posteriormente, los cerebros se mantuvieron en solución criopreservadora a -20 °C hasta su procesamiento para IHQ. Estos hemisferios se cortaron coronalmente en secciones de 40 µm de espesor con vibrátmomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se dividieron en 6 series, cada serie contiene una de cada seis secciones. De esta manera se obtiene un conjunto de secciones seriadas no contiguas que abarcaban el hipocampo dorsal. En el hemisferio derecho se disecó el hipocampo cuidadosamente como se describió anteriormente (**Glowinski y Iversen 1966**) y se almacenó a -80 °C hasta el análisis de WB.

#### 4.2.7 Inmunohistoquímica

Todas las técnicas de IHQ se realizaron sobre secciones con flotación libre. Para cada animal, se procesó una serie por IHQ. Se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (marcador de núcleos celulares neuronales, dilución 1:850, Millipore, MAB377); anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 (marcador de células de microglía, dilución 1: 1000; Wako, 016-20001); y anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP (marcador de astrocitos, dilución 1:1500; DAKO, Z0334). Después de la incubación durante una noche a 4 °C con el anticuerpo primario, las secciones se incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón biotinilado (dilución 1:300; Vector Laboratories, BA-9200) o un anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado (dilución 1:300; Vector Laboratories, BA-1000), según corresponda, durante 120 minutos, se enjuagó e incubó con complejo avidina-biotina-peroxidasa (dilución 1:500; Vector Laboratories, PK-6100) durante 90 min y luego se incubó con DAB o VIP (Vector Laboratories, SK-4600). Las secciones se colorearon con la tinción Nissl para visualizar los puntos de referencia anatómicos. Finalmente, se deshidrataron y se montaron con Vectamount (Vector Laboratories) y se usaron para el análisis de imágenes.

#### 4.2.8 Obtención y análisis de imágenes

Centramos nuestro análisis en las neuronas maduras de la capa piramidal de CA1 y las células microgliales y astrogliales del SR, cuyo límite superior es la capa piramidal de CA1, el límite inferior es el SLM y el límite lateral es el SL del hipocampo dorsal (**Montgomery 1994**). Para la toma de las imágenes utilizamos un microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara de video Olympus DP70 CCD (Tokio, Japón).

#### 4.2.9 Volumen del *Stratum Radiatum*

El volumen del SR se estimó empleando el método de Cavalieri (**Howard y Reed 2004**). Se siguió la fórmula  $V = t \times \Sigma A_i$ , en donde  $t$  es la distancia entre las secciones y  $\Sigma A_i$  representa la suma de áreas de cada sección. Se muestrearon cuatro secciones coronales teñidas con Nissl, separadas 240  $\mu\text{m}$  en el eje anterior-posterior. Para cuantificar el área del SR de cada sección, la muestra se delimitó estableciendo dos límites que varían en función de la morfología de la región y dos límites fijos (laterales). Dichos límites son: la capa piramidal de CA1 como el límite superior, el SLM como límite inferior y un ancho fijo de 520  $\mu\text{m}$  como límite lateral, cuyo punto medio fue el punto máximo de curvatura de la capa piramidal (**Paxinos y Watson 1998**). Es decir, un menor volumen está regido por un acortamiento de la distancia entre los límites superior e inferior.

#### 4.2.10 Análisis de neuronas maduras

Las neuronas maduras fueron detectadas como células NeuN inmunorreactivas (NeuNir). Con el fin de analizar una posible neurodegeneración, se determinó el área inmunorreactiva (IRA) para NeuN. Para este propósito, se segmentaron digitalmente tres secciones por animal y tres campos por sección correspondientes a las neuronas NeuNir de la capa piramidal de CA1, usando el software Image ProPlus v5.1 (IPP, Media Cybernetics). Para cada animal, la suma de las áreas inmunorreactivas se multiplicó por el número de muestreo de la sección (área NeuNir x 6). Para cada dato de área, se determinó el fondo de las imágenes ajustando manualmente la ventana de densidad del sistema (West 1993), hasta que solo se seleccionaron las neuronas NeuNir. Se determinó, además, la longitud promedio del eje mayor del núcleo celular como un parámetro de cambio morfológico; este parámetro se midió manualmente usando la herramienta de medición IPP en un mínimo de 10 núcleos por sección (30 por animal).

#### 4.2.11 Análisis de células microgliales

Para el análisis de las células microgliales en el SR se procedió como fue descripto en la **sección 3.2.11**.

#### 4.2.12 Análisis de células astrogliales

El análisis de células astrogliales se llevó a cabo en CA1 (SR), GD (DH), y CA3 (SL). La evaluación morfológica de astrocitos GFAP inmunoreactivos (GFAPir) fue realizada en SR, DH y SL. Con el fin de estimar el área ocupada por los cuerpos y procesos celulares, los astrocitos GFAPir se segmentaron como se describe en la **sección 4.3.10**, para el caso de neuronas maduras. Para cada animal, la suma de las áreas inmunorreactivas se dividió por el número de secciones (área / sección de GFAPir). El área promedio del grupo Sham se consideró el 100 % de GFAPir y el porcentaje del área de cada animal se calculó con relación a este valor.

Para estudiar la complejidad de procesos astrogliales, los astrocitos GFAPir se evaluaron mediante el análisis de Sholl (**Sholl 1953**). De cada rata, se eligieron 25 astrocitos al azar a partir de imágenes tomadas con gran aumento (1000 X) en secciones coronales representativas que abarcaban el SR y el SL. Posteriormente las imágenes se convirtieron en monocromáticas de 8 bits y se analizaron mediante el plugin de análisis Image J Sholl (<http://imagej.net/Sholl>). Esta técnica consiste en superponer una máscara con anillos concéntricos distribuidos a distancias iguales (5  $\mu\text{m}$ ), centradas en un soma celular. Se calculó el número de intersecciones de los procesos por anillo ( $i$ ) y un índice

de complejidad de las ramificaciones. Posteriormente, se estimó la longitud total de los procesos mediante la suma de los valores de  $i$  para cada anillo multiplicado por 5 (distancia entre anillos). Se promedió para cada astrocito, la longitud de los procesos y su complejidad de ramificaciones a cada distancia del soma; estos datos se utilizaron para el análisis estadístico entre los grupos.

#### **4.2.13 Análisis de Western Blot**

La preparación de las muestras, cuantificación proteica, inmunotransferencia y análisis semicuantitativo se realizó como se describió previamente en la **sección 3.2.12**. Cada muestra, conteniendo igual cantidad de proteínas (75  $\mu$ g), transferidas a membranas de nitrocelulosa, fue incubada con anticuerpos primarios contra la PPA y el péptido  $\beta$ A (1:200; sc-28365, Santa Cruz Biotechnology), pTau (ser 396) (1:200; sc-101815, Santa Cruz Biotechnology), Tau total (1:150; 5A6, DSHB) y  $\beta$ -Actina (1:1000; sc-47778, Santa Cruz Biotechnology). Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente anti-ratón HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-003) o anti-conejo HRP (1:5000, Thermo Fisher Scientific, 32460). Se usó  $\beta$ -actina como control de carga por muestra para PPA,  $\beta$ A, pTau y Tau total.

#### **4.2.14 Análisis estadístico**

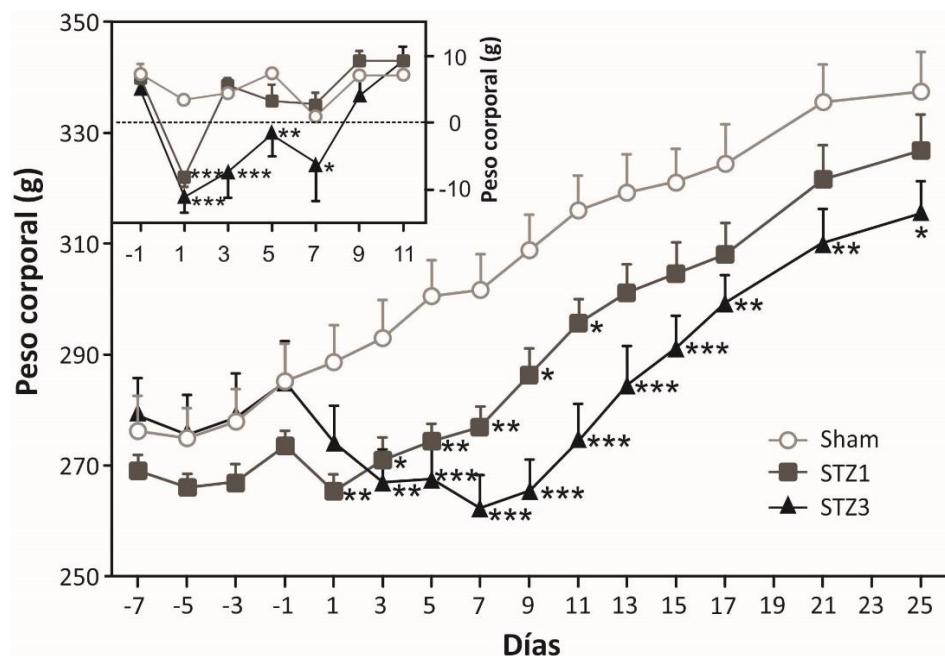
Para la latencia y el análisis de errores del test BM, se promediaron los datos de cada AT; estos parámetros junto con el PC se analizaron mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas, teniendo en cuenta los factores grupos y días. En el test NOR, las comparaciones del tiempo total de exploración de los objetos familiares y novedosos durante las sesiones de entrenamiento y reconocimiento se examinaron mediante t-Test de Student pareado. Los datos estereológicos y los de WB se analizaron mediante ANOVA de una vía o test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se usaron pruebas post-hoc cuando fue apropiado. Todos los datos se representaron como media  $\pm$  SEM y se estimaron utilizando el software *GraphPad Prism 6*. (Graph- Pad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Se consideraron diferencias significativas a valores de  $P < 0,05$ .

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Reducción del peso corporal en las ratas tratadas con STZ**

Como se describió en la sección de métodos, los cambios en el PC se evaluaron en todos los animales en intervalos regulares. Los resultados de la **Figura 26** y su recuadro muestran que el peso de las ratas de los grupos STZ1 y STZ3 disminuyó hasta DEx +1 y +7, respectivamente. Después de ese período,

aunque ambos grupos con STZ comenzaron a recuperar peso, se mantuvo una significativa reducción del PC en las ratas tratadas con STZ3 en comparación con los animales Sham, hasta el DEx +25 (ANOVA de dos vías,  $P < 0,0001$ ).



**Figura 26. Variación temporal del peso corporal.** El PC de todas las ratas se registró a lo largo del experimento cada dos días. Se observó una significativa reducción del PC en las ratas tratadas con STZ3 hasta el DEx +25. El cuadro muestra los valores de ganancia de PC desde el DEx -1 hasta el DEx +11. Abreviaturas: DEx, día experimental; PC, peso corporal. N = 6 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones se realizaron versus los datos correspondientes del grupo Sham. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.3.2 Efecto de la administración de STZ-icv en el aprendizaje y la memoria de referencia espacial en ratas

##### 4.3.2.1 Latencia

Para evaluar la memoria espacial en ratas, utilizamos el test BM modificado. En los ensayos de adquisición, la latencia para alcanzar el agujero de escape disminuyó rápidamente después del AT2, en los grupos Sham y STZ1, lo que indica curvas de aprendizaje similares. Sin embargo, la latencia se mantuvo consistentemente más alta en el grupo STZ3 y fue significativamente diferente en el AT6 en comparación con el grupo Sham (Figura 27.A. ANOVA de dos vías MR,  $P = 0,02$ ).

En los PT, cuando se retiró la caja de escape para evaluar retención de la memoria espacial, el grupo STZ3 mostró una latencia más larga para alcanzar por primera vez el agujero meta, tanto en el PT1 (1

día después del AT6) como en el PT2 (5 días después del AT6); este aumento fue significativo en el PT2 (**Figura 27.B.** ANOVA de una vía,  $P = 0,01$ ), mientras que fue solo una tendencia en el PT1 (**Figura 27.B.** ANOVA de una vía,  $P = 0,2$ ).

#### **4.3.2.1 Errores**

Durante los ensayos de entrenamiento, el número de errores cayó bruscamente en los animales Sham y STZ1, indicando curvas de aprendizaje similares. Sin embargo, en el grupo STZ3, el número de errores disminuyó ligeramente hasta alcanzar una meseta en los AT2-5 y finalmente aumentó en el AT6 (**Figura 27.E.** ANOVA de dos vías MR,  $P = 0,06$ ).

En las sesiones de prueba, este parámetro no ha mostrado diferencia entre los tres grupos en el PT1 (**Figura 27.F.** ANOVA de una vía,  $P = 0,77$ ). Sin embargo, en el PT2 las ratas STZ3 mostraron un aumento significativo en el número de errores cometidos hasta alcanzar el agujero meta en comparación con las ratas Sham y STZ1 (**Figura 27.F.** ANOVA,  $P = 0,006$ ).

#### **4.3.2.2 Frecuencia de exploración total**

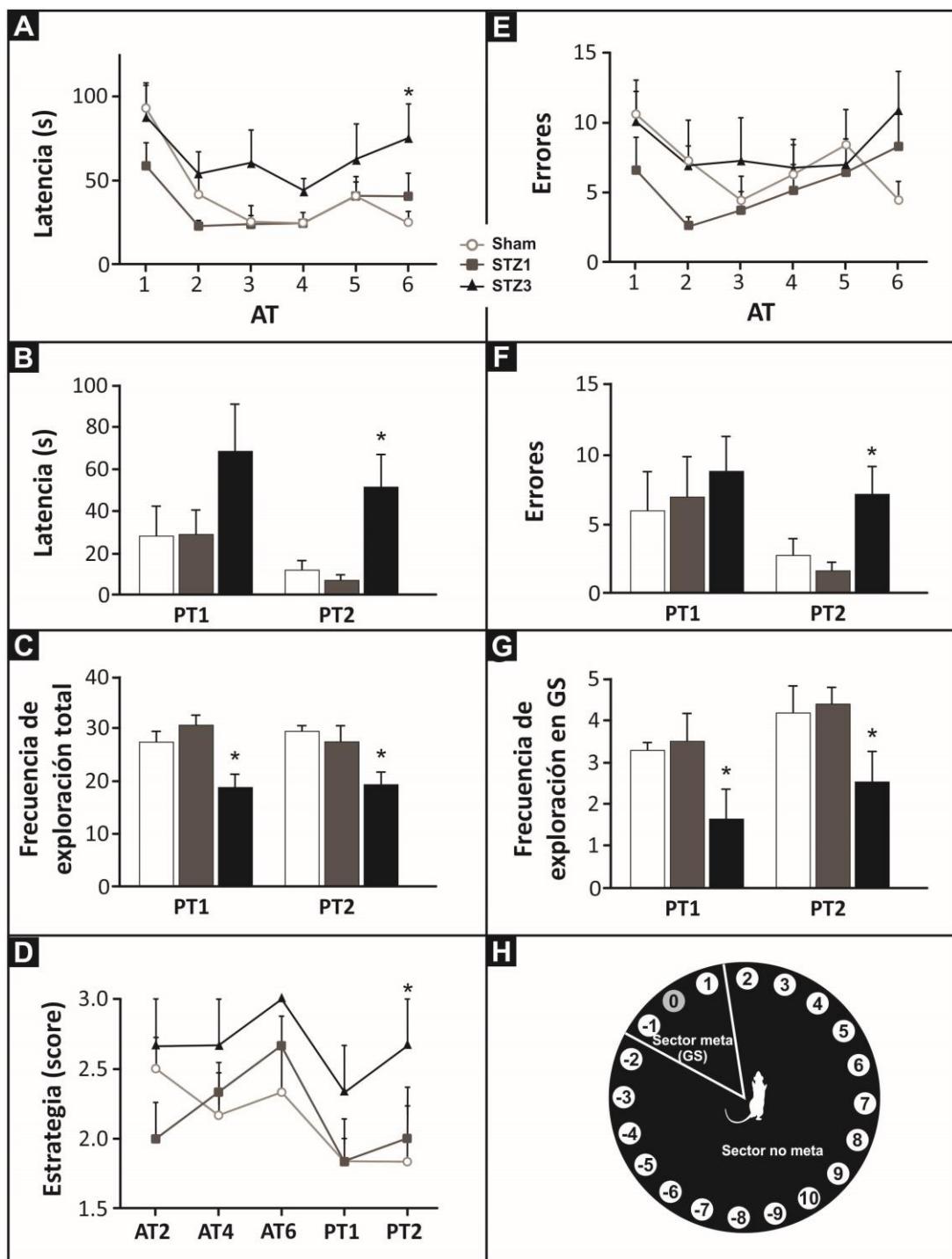
Se observó una disminución significativa en la frecuencia de exploración total (suma del número de exploraciones totales en los agujeros del laberinto) en los animales STZ3 en ambos ensayos de prueba (PT1 y PT2) (**Figura 27.C.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0058$  y  $P = 0,0204$  para PT1 y PT2, respectivamente).

#### **4.3.2.3 Frecuencia de exploración en el sector meta**

La frecuencia de exploración del GS (número promedio de exploraciones en los agujeros 0, 1 y -1) fue considerablemente menor en las ratas STZ3 en ambos PT (**Figura 27.G.** ANOVA de una vía,  $P = 0,03$  y  $P = 0,04$  para PT1 y PT2, respectivamente), lo que corrobora un deterioro en la memoria espacial. Contrariamente, la frecuencia de exploración para el sector no meta se vio menos afectada por la administración de STZ (datos no mostrados).

#### **4.3.2.4 Estrategias de búsqueda**

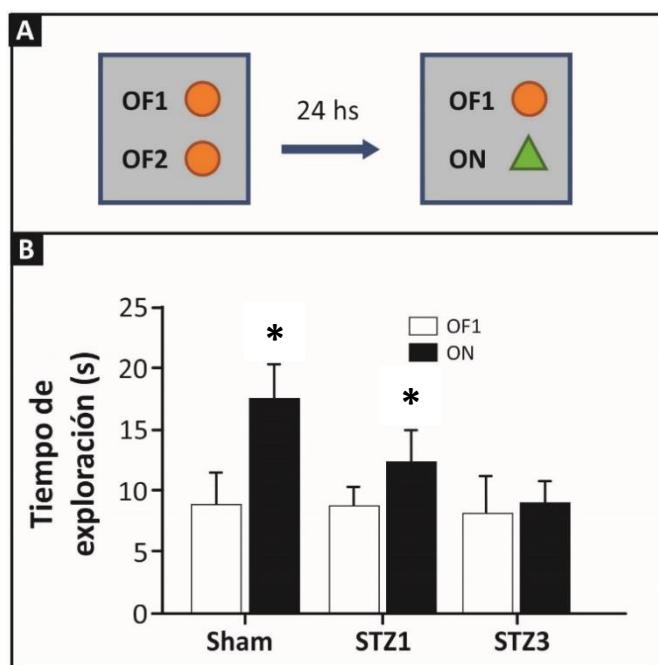
Los resultados de las estrategias de búsqueda se muestran en la **Figura 27.D.** Los animales Sham y STZ1 mostraron puntajes de estrategia similares. Comparado con el grupo Sham, el grupo STZ3 tuvo puntuaciones significativamente mayores ( $P = 0,0176$ ), con un incremento en el porcentaje de estrategia aleatoria (random) junto con una disminución en el porcentaje de estrategia espacial (datos no mostrados) demostrando la preferencia por una estrategia de búsqueda menos efectiva.



**Figura 27. Efecto de la STZ sobre el desempeño cognitivo en el laberinto de Barnes.** Latencia a la caja de escape en AT (A) y PT (B); la latencia se mantuvo más alta en el grupo STZ3 en AT y PT. Número de errores en AT (E) y PT (F); en el grupo STZ3, los errores aumentaron en el AT6 y PT2. Frecuencia de exploración total (C) y frecuencia de exploración en GS (G) en el PT1 y PT2; La frecuencia de exploración total y en GS fue significativamente menor en los animales STZ3 versus Sham, en ambos PT. Puntajes (score) de las estrategias de búsqueda del agujero meta (D); el grupo STZ3 mostró un aumento significativo en los scores, lo cual indica una preferencia por la estrategia aleatoria. Representación esquemática del laberinto (H). Abreviaturas: AT, ensayo de adquisición; GS, sector meta; PT, ensayo de prueba. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. N = 6 por grupo. Las comparaciones se realizaron versus los datos correspondientes del grupo Sham. \* P <0.05.

#### 4.3.3 Deterioro de la memoria de reconocimiento en ratas tratadas con STZ-icv

El día 23 después de la inyección de STZ-icv, en la sesión de entrenamiento que involucró dos objetos familiares idénticos (OF1 y OF2), como era de esperar, todas las ratas exploraron tiempos similares ambos objetos (datos no mostrados). El día 24, en la sesión de reconocimiento, cuando los animales fueron expuestos a un objeto familiar (FO1) y a uno novedoso (ON) (**Figura 28.A**), el grupo Sham mostró una discriminación significativa entre los objetos (t-Test pareado,  $P < 0,05$ ). También el grupo STZ1 pasó más tiempo explorando el objeto novedoso (t-Test pareado,  $P < 0,05$ ). Sin embargo, las ratas STZ3 invirtieron cantidades comparables de tiempo explorando ambos objetos, lo que evidenció que los animales no lograron discriminar entre objeto familiar y novedoso, es decir, mostraron un deterioro en la memoria de reconocimiento (**Figura 28.B**).



**Figura 28. Efecto de la STZ sobre el comportamiento en el test de reconocimiento del objeto nuevo.** Esquema del diseño del test NOR (A); se realizó la sesión de entrenamiento con dos objetos idénticos y, 24 hs después, la sesión de reconocimiento de los objetos familiar y nuevo. Tiempo de exploración de los objetos familiar (OF1) y nuevo (ON) en la sesión de reconocimiento (B); las ratas Sham y STZ1 mostraron preferencia por la exploración del objeto nuevo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. N = 6 por grupo. \* $P < 0,05$ .

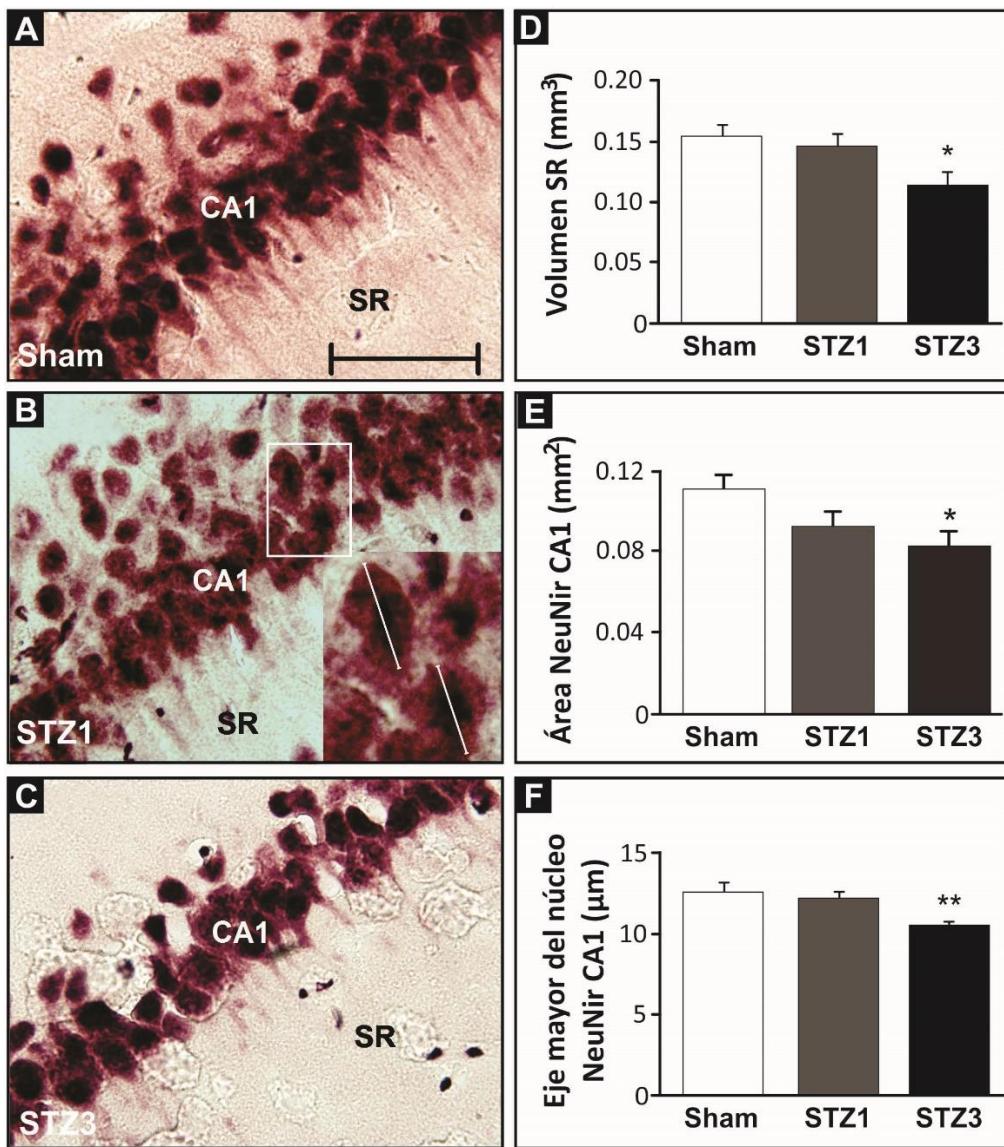
#### **4.3.4 Cambios morfológicos en el hipocampo de ratas tratadas con STZ-icv**

##### **4.3.4.1 Análisis del volumen hipocampal**

El grupo STZ3 mostró una disminución significativa del volumen del SR respecto al Sham (**Figura 29.D.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0235$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos STZ1 y Sham.

##### **4.3.4.2 Análisis de neuronas maduras**

Para determinar si la alteración del comportamiento se asoció con cambios morfológicos en el cerebro, se analizaron las neuronas maduras NeuNir en el hipocampo dorsal de la rata. El área NeuNir de la capa piramidal de CA1 se usó como índice de pérdida neuronal. En este caso, se observó una reducción abrupta de aproximadamente el 26 % de la capa celular de CA1 en animales STZ3 frente al grupo Sham (**Figura 29.E.** ANOVA de una vía,  $P = 0,05$ ). Además, se empleó la longitud promedio del eje mayor del núcleo como parámetro de alteraciones de la morfología celular. Respecto a esto, los animales con STZ3 mostraron una reducción del eje mayor del núcleo celular de aproximadamente un 16 % (**Figura 29.F.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0034$ ) en comparación con las ratas Sham. Sin embargo, las ratas STZ1 no mostraron diferencias significativas en comparación con las ratas Sham en ambos parámetros.

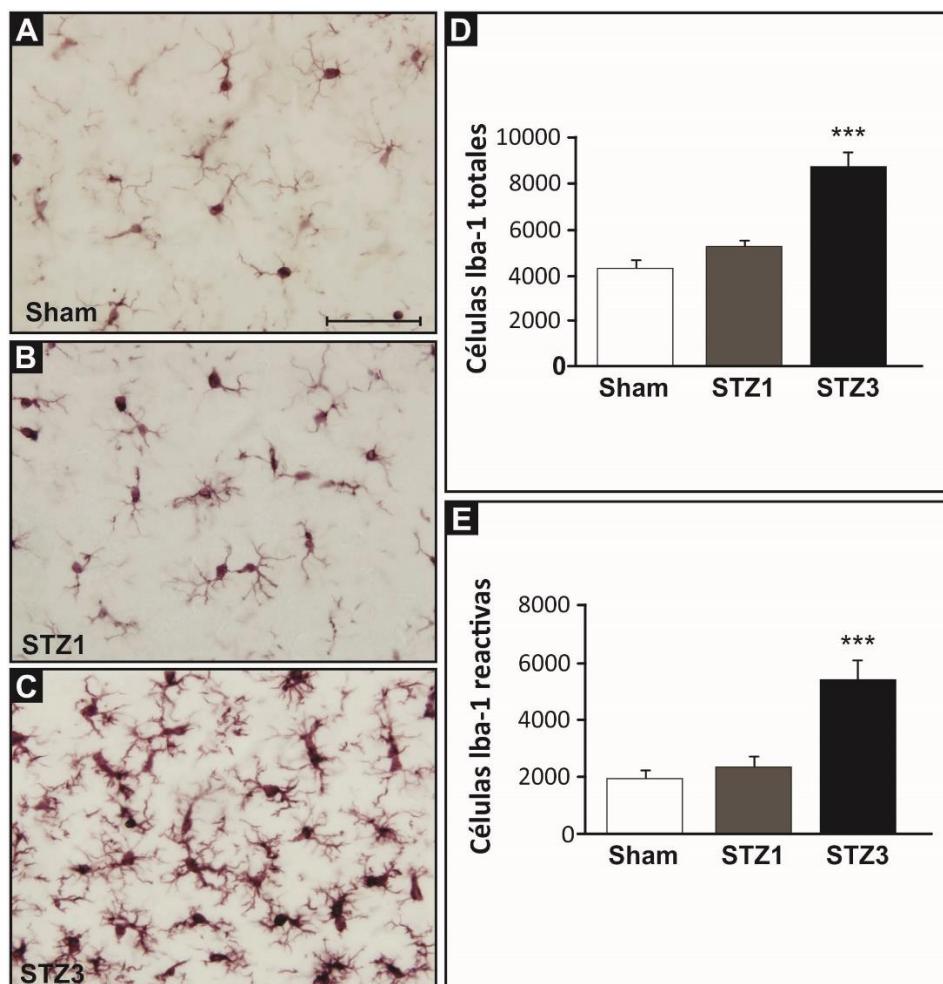


**Figura 29. Análisis morfométrico del volumen del *Stratum Radiatum* (SR) y de neuronas piramidales maduras en CA1.** Imágenes de CA1, representativas de cada grupo, que muestran células NeuN inmunorreactivas (NeuNir) (A, B y C) de la capa piramidal y por debajo el SR. Se marca el eje mayor del núcleo de las células NeuNir (imagen aumentada en B). Cuantificación del volumen del SR (D) que evidencia un proceso de atrofia del hipocampo solo en el grupo tratado con STZ3. Se observó una reducción del área NeuNir (E) y del tamaño del núcleo neuronal (F) en la capa piramidal CA1 del hipocampo en el grupo STZ3. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ . N = 6 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones se hicieron versus los datos del grupo Sham. \*P <0.05; \*\*P <0.01.

#### 4.3.4.3 Análisis de células microgliales

Las células microgliales Iba-1ir se contaron y clasificaron como no reactivas y reactivas en el SR hipocampal. No hubo diferencias significativas en el número de células microgliales no reactivas para los tres grupos experimentales (datos no mostrados). Además, en las ratas STZ1 el número de células

Iba-1 totales (suma de no reactivas y reactivas) e Iba-1 reactivas (Figura 30.D y E, respectivamente) fueron similares a las ratas Sham. Sin embargo, se observó un aumento notable en el número de células Iba-1 totales e Iba-1 reactivas (Figura 30.D y E. ANOVA de una vía,  $P < 0,0001$  y  $P = 0,0003$ , respectivamente) en el grupo STZ3 respecto al Sham.

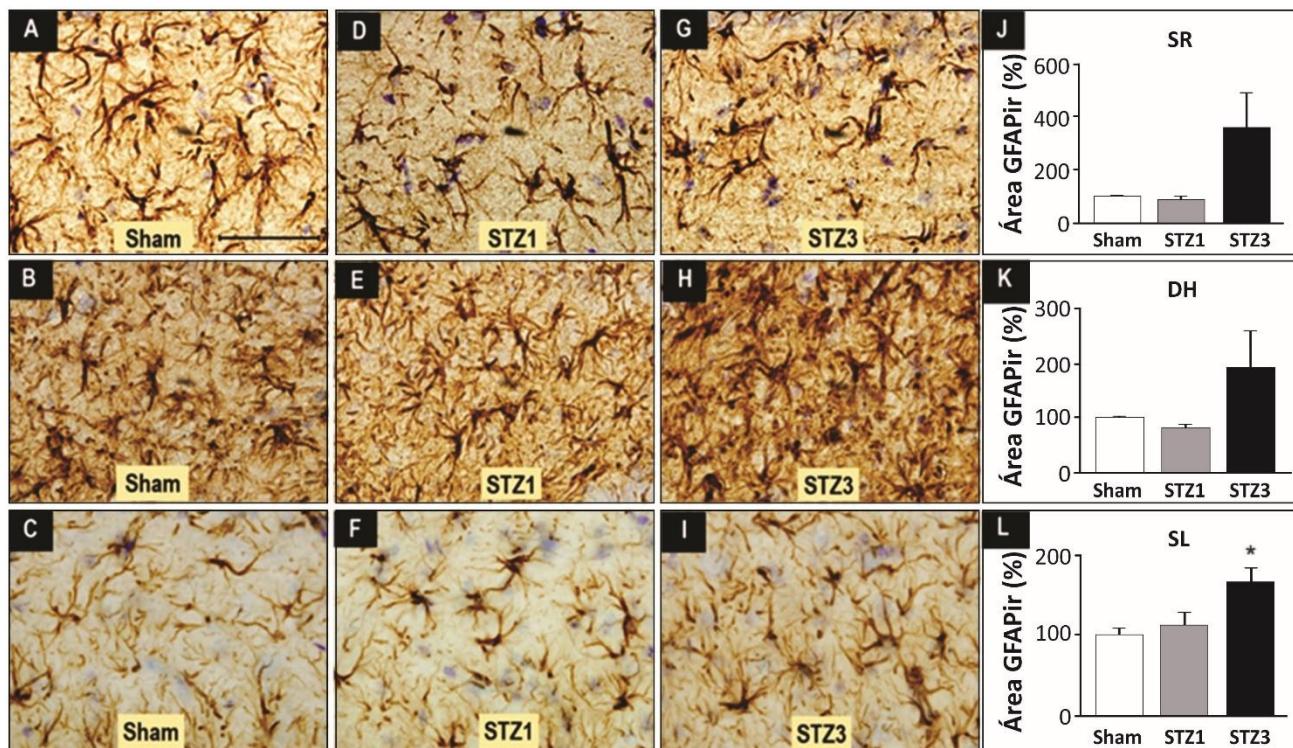


**Figura 30. Células microgliales Iba-1 inmunorreactivas en el Stratum Radiatum del hipocampo.** Microfotografía ampliada (600 X) del SR, en animales representativas de cada grupo, que muestra las células Iba-1ir (A, B y C). Cuantificación del número de células Iba-1ir totales (D) y reactivas (E) que muestra un aumento en el número de células microgliales en ratas STZ3. Barra de escala 200  $\mu$ m. N = 6 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones se hicieron versus los datos del grupo Sham. \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.3.4.4 Análisis de células astrogliales

El porcentaje de área GFAPir (astroglial) se evaluó en el SR, DH y SL hipocampal (Figura 31.A-I). El grupo STZ3 mostró un incremento del área GFAPir respecto de las ratas Sham en SR y DH que no

alcanzó a ser estadísticamente significativo por la dispersión de los datos (**Figura 31.J-K**. SR: test no paramétrico de Kruskal-Wallis,  $P = 0,190$ . DH: ANOVA de una vía,  $P = 0,3272$ ). Por otro lado, el área GFAPir del grupo STZ3 en SL mostró un aumento significativo respecto al Sham (**Figura 31.L**. ANOVA de una vía,  $P = 0,0192$ ). No se encontraron diferencias significativas entre STZ1 y Sham para este parámetro.

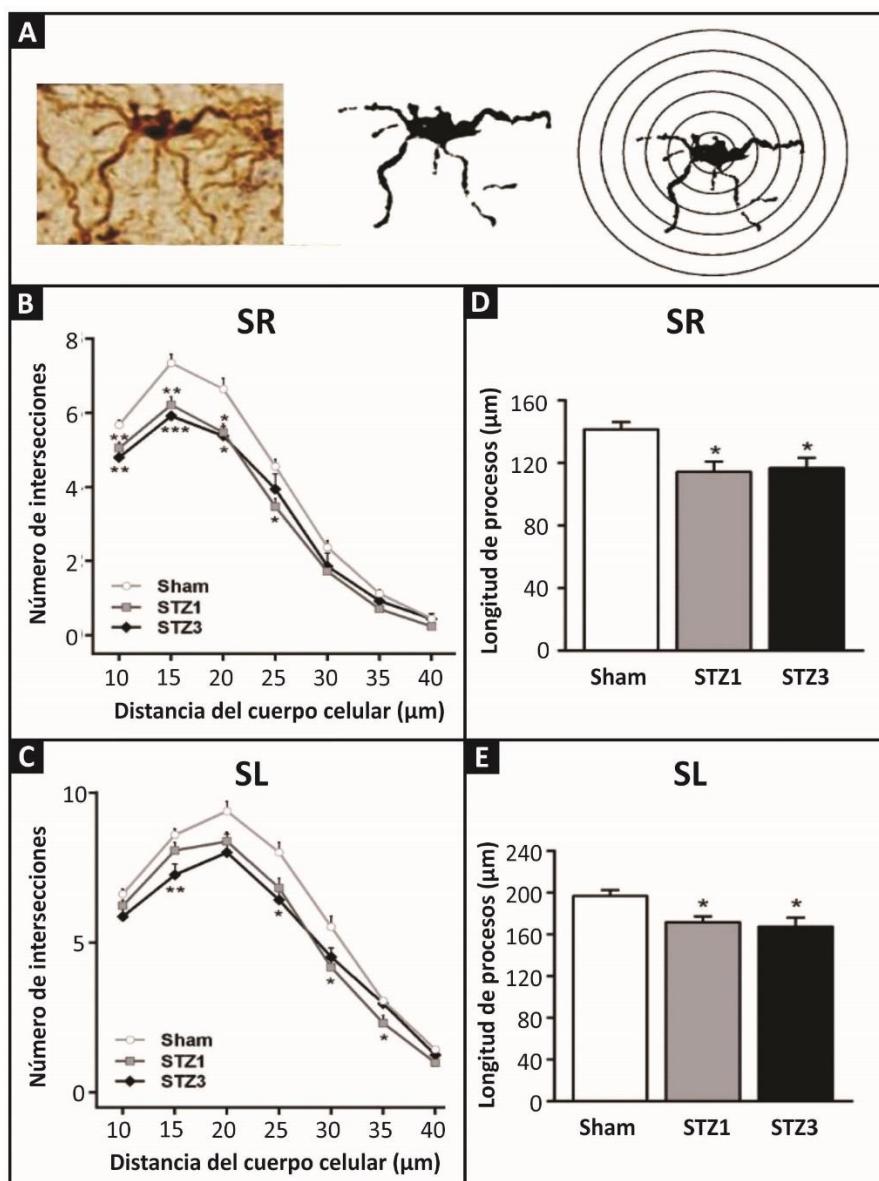


**Figura 31. Astrocytes GFAP immunoreactive in the dorsal hippocampus.** Imágenes de representativas de cada grupo que muestran las células GFAPir (1000 X) del SR de CA1 (A-C), del DH del giro dentado (D-F) y del SL de CA3 (G-I). Los gráficos de barras muestran un aumento en el área GFAPir de las ratas STZ3 en el SR (J), DH (K) y SL (L). Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ . N = 6 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones se hicieron *versus* los datos del grupo Sham. \* $P < 0,05$ .

No se evidenciaron diferencias significativas en el número de células GFAPir en SR, DH y SL para los tres grupos experimentales (datos no mostrados. SR:  $P = 0,1158$ . SL:  $P = 0,2143$ . DH:  $P = 0,1072$ ). Respecto al análisis de Sholl (**Figura 32.A**), se observó una caída importante en la complejidad de las ramificaciones de los astrocitos del SR (CA1) hasta las 20  $\mu\text{m}$  y 25  $\mu\text{m}$  del soma celular para los animales STZ1 y STZ3, respectivamente, en comparación con los animales Sham (**Figura 32.B**. ANOVA de una vía,  $P = 0,001$ ;  $P = 0,0005$ ;  $P = 0,006$  y;  $P = 0,038$  para 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Del mismo modo, se evidenció una reducción en la complejidad de ramificaciones en el SL (CA3) a los

30 y 35  $\mu\text{m}$  del soma celular en los animales STZ1 y a las 15 y 25  $\mu\text{m}$  en los animales STZ3, en comparación con los animales Sham (**Figura 32.C.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0124$ ;  $P = 0,0993$ ;  $P = 0,0316$ ;  $P = 0,0164$  y;  $P = 0,0297$  para 15, 20, 25, 30 y 35  $\mu\text{m}$ , respectivamente).

Consistentemente, se observó una reducción en la longitud media de los procesos astrocitarios en las ratas tratadas con STZ respecto a las ratas control tanto en el SR (**Figura 32.D.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0094$ ) como en el SL (**Figura 32.E.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0169$ ), este parámetro se estimó como la suma de los valores de  $i$  para cada anillo multiplicado por 5. Además, el número de ramificaciones primarias (procesos que emergen del soma celular) de los astrocitos del SR se vio significativamente afectado por la STZ-icv en comparación con el grupo Sham (datos no mostrados, ANOVA de una vía,  $P = 0,008$ ), siendo la reducción más pronunciada en el grupo STZ3 que en STZ1. Por el contrario, este parámetro no se vio significativamente afectado en el SL (datos no mostrados, ANOVA de una vía,  $P = 0,2261$ ). En conjunto, estos resultados indican que se perdieron ramificaciones enteras en los astrocitos en CA1, mientras que en CA3 solo se perdieron ramas distales.

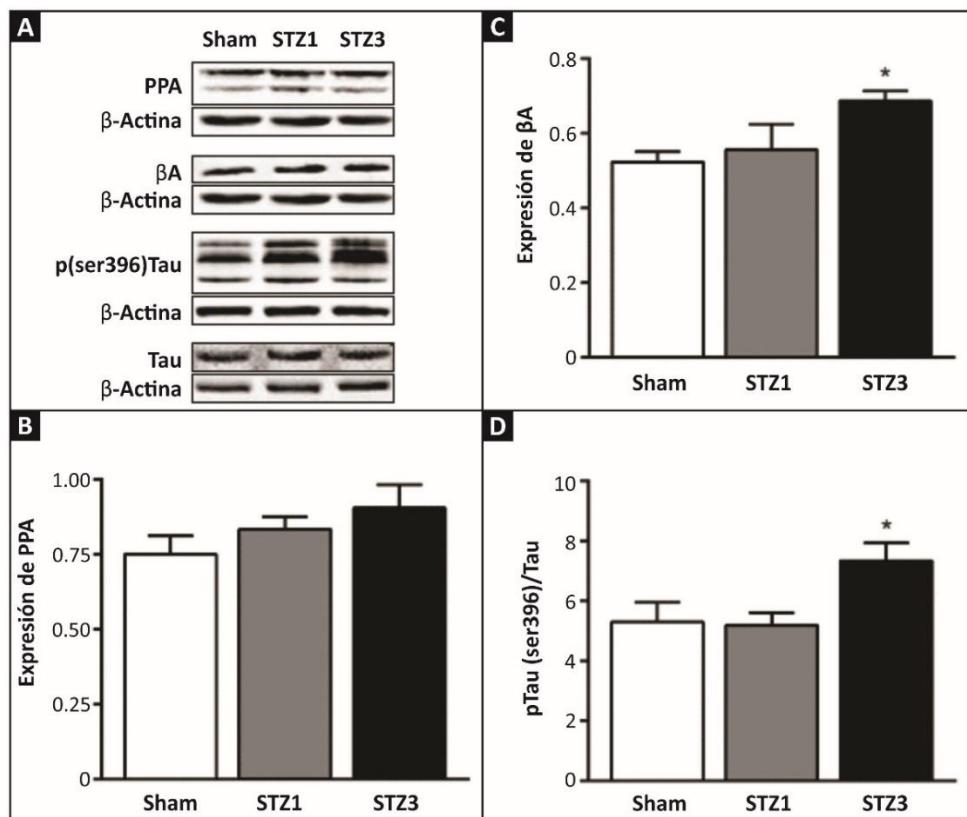


**Figura 32. Análisis de Sholl de astrocitos GFAP inmunorreactivos en el hipocampo dorsal.** Micrografía de un astrocito y el resultado de superponer una máscara con anillos concéntricos distribuidos a distancias iguales (5 μm) y centrada en el soma de la silueta del astrocito GFAPir (A). Se grafica el número de intersecciones de los procesos astrocitarios por anillo como parámetro de la complejidad de las ramificaciones de astrocitos en el SR de CA1 (B) y en el SL de CA3 (C). En ambas regiones se observó una caída importante en la complejidad de las ramificaciones en animales tratados con STZ. Longitud promedio de los procesos astrocitarios en el SR (D) y el SL (E); se observó una reducción en la longitud media de los procesos astrocitarios en las ratas tratadas con STZ. Abreviaturas: SL, Stratum Lacunosum; SR, Stratum Radiatum. N = 25 astrocitos por rata. N = 6 por grupo. Los datos se expresan como media ± SEM. Las comparaciones se hicieron versus los datos del grupo Sham. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

#### **4.3.5 Efecto del tratamiento STZ-icv en los niveles proteicos de PPA, $\beta$ A y pTau/Tau en el hipocampo de las ratas**

La escisión patológica de la PPA y la acumulación del péptido  $\beta$ A son características de la EA y constituyen criterios relevantes para la validación de los modelos experimentales de dicha enfermedad. Con el fin de explorar el efecto de STZ en la producción de  $\beta$ A en el hipocampo, determinamos los niveles de la PPA y del péptido  $\beta$ A por WB. Aunque no hubo diferencias significativas en los niveles de PPA para los tres grupos experimentales (**Figura 33.A,B.** ANOVA de una vía,  $P = 0,2439$ ), STZ-icv induce una tendencia a aumentar dichos niveles. Si bien el análisis de WB no reveló diferencias en los niveles de  $\beta$ A entre los grupos STZ1 y Sham, se observó un aumento significativo en los niveles de  $\beta$ A en el grupo STZ3 en comparación con el grupo Sham (**Figura 33.A,C.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0486$ ).

Los ovillos neurofibrilares intracelulares que contienen proteína Tau hiperfosforilada (pTau) son una característica neuropatológica importante de la EA. Estudiamos la acumulación de Tau hiperfosforilada en el hipocampo de ratas STZ-icv mediante la determinación de la relación pTau (ser396) / Tau total. El análisis de WB reveló un aumento significativo en los niveles de proteína pTau (ser396) en el grupo STZ3 (ANOVA de una vía,  $P = 0,0337$ ) en comparación con el grupo Sham (datos no mostrados). Además, hubo un aumento significativo en la relación pTau (ser396) / Tau total en el grupo STZ3 en comparación con el grupo Sham (**Figura 33.A, D.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0284$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de la proteína pTau (ser396) (datos no mostrados) y en la proporción pTau / Tau entre los grupos STZ1 y Sham. No hubo diferencias significativas en los niveles de proteína Tau total para los tres grupos experimentales estudiados (datos no mostrados. ANOVA de una vía,  $P = 0,7723$ ).



**Figura 33. Efecto de la STZ sobre los niveles de proteínas marcadoras de la EA en el hipocampo de la rata.** Análisis de WB que muestra las bandas correspondientes a PPA, βA, pTau (ser396), Tau total y β-actina, representativas para cada grupo experimental (A). Semicuantificación de los niveles relativos de expresión de PPA (B), βA (C) y de la relación pTau (ser396)/Tau total (D); como control de carga de la muestra, en todos los casos, se usó la densidad relativa de β-actina. STZ3 indujo un aumento significativo de βA y de la relación pTau (ser396)/Tau total. N = 6 por grupo. Los datos se expresan como media ± SEM. Las comparaciones se hicieron versus el grupo Sham. \*P <0.05.

#### 4.4 Discusión

El modelo STZ-icv ha sido propuesto como un modelo representativo de EAE (Hoyer 1998; Salkovic-Petrisic y Hoyer 2007; Mayer, Nitsch y Hoyer 1990), ya que induce efectos bioquímicos, estructurales y cognitivos junto con un estado cerebral resistente a la insulina de una manera estandarizada y reproducible en todas las especies investigadas (ratas, ratones y monos). Además, el modelo STZ-icv demuestra varias ventajas sobre los modelos de EA en ratones transgénicos (Salkovic-Petrisic y col. 2013).

Anteriormente se reportó que la inyección de STZ-icv produce una marcada pérdida inicial de PC en ratas (Shoham y col. 2003; Pathan y col. 2006). En concordancia con estos hallazgos, nuestro estudio también evidenció que el tratamiento con STZ-icv causó una reducción significativa en el PC. El grupo

STZ3 mostró el PC más bajo durante todo el experimento. En efecto, después de la inyección icv, las ratas Sham ganaron PC mientras que las ratas STZ-icv disminuyeron su PC hasta el DEx +1 y +7 en los grupos STZ1 y STZ3, respectivamente. Un trabajo previo mostró una pérdida inicial de peso e hipofagia en ratas tratadas con STZ-icv (**Majkutewicz y col. 2016**). Dicho estudio también demostró que las ratas presentan dilatación del tercer ventrículo y del espacio ventricular. Observamos un aumento similar de los ventrículos de las ratas STZ3 (datos no mostrados). Esto podría explicar la pérdida de peso temporal observada después de la inyección icv de STZ e incluso podría estar afectando la cognición de los animales.

Creciente evidencia demuestra que las ratas tratadas con STZ-icv presentan problemas de aprendizaje y memoria en el MWM, utilizando distintas dosis de STZ (0,5-6 mg/kg de PC) y a diferentes tiempos después de la inyección (**Grünblatt y col. 2007; Salkovic-Petrisic y col. 2015; Rajasekar y col. 2017**). De acuerdo con esto, respecto a los parámetros de aprendizaje, nuestros estudios muestran que la STZ-icv 3 mg/kg causa una disminución progresiva del tiempo de latencia junto con una tendencia a incrementar los errores en el test BM. En comparación con protocolos más extensos del BM (**Rosenfeld y Ferguson 2014; Gawel y col. 2016; de la Tremblaye y col. 2017**), en este trabajo se abrevió el número de ensayos de adquisición (seis AT en tres días) pero fue suficiente para detectar la disminución de la eficiencia del aprendizaje. Además, estudios recientes de nuestro grupo demostraron la utilidad de este protocolo BM para evaluar la alteración de la memoria espacial en ratas viejas (**Morel y col. 2015**). Trabajos anteriores de BM identificaron que el rendimiento de ratas intactas fue equivalente en los primeros dos PT, pero luego se habituaron y no pudieron ser testeadas (**Uriarte, Ogundele y Pardo 2017**). En el presente estudio, se evaluó con el BM, por primera vez en el modelo STZ-icv, la retención de la memoria espacial a corto y largo plazo, 1 y 5 días después del último AT, en el PT1 y PT2, respectivamente.

En ambos PT se observó una caída significativa de la frecuencia de exploración del GS para ambas dosis STZ-icv. Al menos dos componentes contribuyen a la magnitud de la frecuencia de exploración del GS, la retención de memoria espacial y la actividad de búsqueda. Esto último depende principalmente de la motivación para buscar el agujero de escape. Algunos estudios sugieren que los ratones y las ratas tratadas con STZ-icv tienen dificultades motivacionales (**Rostami y col. 2017; Amiri y col. 2017**). En el presente trabajo, el comportamiento motivacional se evaluó como la frecuencia de exploración total y nuestros resultados muestran una disminución en los animales inyectados con STZ3, pero no en el grupo STZ1. Por lo tanto, las ratas STZ3 muestran una pérdida de motivación y de

la retención de la memoria espacial a corto y largo plazo. Por otra parte, el rendimiento de la memoria se evaluó a través del tiempo de latencia al agujero meta y del número de errores (exploraciones de agujeros diferentes de la del meta). Nuestros datos indican que la disrupción de la memoria por STZ3-icv es más fuerte en la retención a largo plazo, ya que los animales tardan mucho más tiempo en encontrar el agujero de escape y son más erráticos. Este déficit no se observó con la dosis de STZ 1 mg/kg. Dichos resultados concuerdan con estudios previos (**Rostami y col. 2017; Mehla, Pahuja y Gupta 2013**) que muestran que el deterioro de la memoria de referencia en animales inducido por STZ-icv depende de la dosis. Además, el uso frecuente de la estrategia de búsqueda aleatoria para localizar el agujero meta durante los ensayos de adquisición puede ser la base del bajo rendimiento de las ratas STZ3, ya que fueron menos eficientes en encontrar el agujero de escape que las Sham. Vale la pena señalar que, antes del inicio de la evaluación cognitiva, se evaluó el rendimiento motor y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados) de acuerdo con estudios previos (**Ozkay y col. 2012; Saxena, Patro y Nath 2011; Bokare y col. 2018**). En líneas generales, estos resultados coinciden con los déficits cognitivos observados en el WMM (**Gao y col. 2014; Majkutewicz y col. 2016; Salkovic-Petrisic y col. 2006**) e indican que la dosis de STZ3 puede inducir déficits de aprendizaje espacial en el BM.

Se ha propuesto que el hipocampo interviene en la memoria de reconocimiento de objetos (**Clark Zola y Squire 2000**). Por lo tanto, una alteración en el test BM predeciría un deterioro en el test NOR. En efecto, nuestros datos mostraron que la inyección de STZ 3 mg/kg indujo un déficit en la memoria de reconocimiento de objetos a largo plazo (24 hs después de la sesión de entrenamiento). Este hallazgo es consistente con un estudio previo en ratas en el que se observó déficit de la memoria de reconocimiento de objetos a largo plazo, 3 semanas post STZ3-icv (**Kheradmand, Hajizadeh Moghaddam y Zare 2018**). Si bien no detectamos cambios en la memoria de reconocimiento en el grupo STZ1, sugerimos que un mayor tiempo post-inyección de STZ1 revelaría un deterioro significativo de la memoria de reconocimiento de objetos, ya que otros estudios informaron que los efectos perjudiciales de la dosis de 1 mg/kg de STZ son principalmente progresivos (**Grünblatt y col. 2007; Shai Shoham y col. 2007; Knezovic y col. 2015; Kraska y col. 2012**). Shoham y col. informaron que la memoria de reconocimiento de objetos a largo plazo se ve deteriorada 4 semanas después de la inyección de STZ-icv (**Shoham y col. 2007**). De acuerdo con esto, Rostami y col. describieron un déficit de memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo (1 h después de la sesión de entrenamiento) evaluado a las 4, 10 y 14 semanas después de la inyección de STZ-icv (**Rostami y col.**

2017). En conjunto, estos datos sugieren un inicio tardío en el deterioro de la memoria de reconocimiento de objetos inducido por STZ1.

Los estudios de EA en humanos muestran que una reducción en el volumen del hipocampo se correlaciona con la función cognitiva global y el rendimiento en tareas de memoria (Su y col. 2018; Elgh y col. 2006; Stoub y col. 2006). En nuestro estudio, la administración de STZ3-icv dio como resultado la reducción del volumen del SR en el hipocampo dorsal. El SR es una de las áreas más afectadas en la EA y se ha propuesto como posible biomarcador temprano para detectar la EA en la etapa de deterioro cognitivo leve (Su y col. 2018).

En otro estudio, se propuso que la reducción del volumen y la pérdida neuronal en CA1 del hipocampo son los primeros signos de la EA y están fuertemente correlacionados con el estado cognitivo de las personas (Bobinski y col. 1998). En nuestros experimentos, observamos una reducción significativa de la capa celular piramidal de CA1 en el hipocampo en las ratas STZ3 y una reducción parcial en el grupo STZ1. Anteriormente se informó que la inmunomarcación de NeuN se correlaciona con la muerte neuronal (Davoli y col. 2002). Curiosamente, también se informó un mayor número de células apoptóticas en el modelo STZ-icv de EAE (Hashemi-Firouzi y col. 2017). Además, se observó que STZ induce neurodegeneración en el hipocampo, particularmente en CA1 (Majkutewicz y col. 2016). Basándonos en estos datos, sugerimos que la disminución en la inmunomarcación de NeuN en el grupo STZ3 se asocia con muerte neuronal en el hipocampo dorsal. Además, se observó una reducción severa de los núcleos celulares de las neuronas en las ratas STZ3. Así, específicamente, en el grupo STZ3 encontramos cambios notables en la morfología de las neuronas (atrofia y contracción). Sin embargo, las células de CA1 en el hipocampo del grupo STZ1 mostraron una morfología similar a las del grupo Sham. Por lo tanto, el modelo de rata STZ3-icv muestra una atrofia estructural consistente en la capa piramidal y el SR de CA1 que contribuiría con el deterioro de la memoria. En contraste, otros modelos de EA en roedores no muestran cambios de volumen (Klementiev y col. 2007) ni pérdida neuronal en un período equivalente al evaluado por nosotros (Wirths y Bayer 2010).

La neuroinflamación, reflejada en la astrogliosis y la activación microglial, es otra característica que se cree que contribuye a la patogénesis de la EA (McGeer y McGeer 2004). La gliosis reactiva en la histopatología de EA refleja una morfología anormal de astrocitos y microglía.

La microglía son células fagocíticas residentes del SNC que exploran dinámicamente el medio y desempeñan papeles cruciales en el mantenimiento del tejido cerebral, la respuesta a las lesiones y la defensa de los patógenos (**Nayak, Roth y McGavern 2014; Colonna y Butovsky 2017**). La microglía se ha convertido en un actor crucial en la patogénesis de la EAE y existe considerable evidencia de que es responsable del daño neuronal en dicha patología (**McGeer y McGeer 2004**). Nuestros resultados son consistentes con estas alteraciones y demuestran que hay una proliferación significativa de la microglía reactiva en el hipocampo del modelo STZ3-icv. La activación microglial prolongada conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias que exacerbía la neuroinflamación, contribuyendo a la pérdida neuronal y al deterioro cognitivo (**Hansen, Hanson y Sheng 2018; Streit, Mrak y Griffin 2004; Perry, Nicoll y Holmes 2010; Jiang, Yu y Tan 2012**). Por lo tanto, comprender las señales que activan a la microglía para reducir los circuitos vulnerables podría proporcionar información importante sobre las enfermedades neurodegenerativas y arrojar luz sobre nuevos objetivos terapéuticos. Dada la actividad diversa y compleja de la microglía en el cerebro sano y enfermo, existe una necesidad crítica de nuevos biomarcadores que puedan relacionar estados microgliales funcionales específicos con la progresión de la enfermedad.

Los astrocitos son responsables de mantener la homeostasis en el SNC. En la EA se ha informado tanto la reactividad como los cambios atróficos de la astroglía (**Rodríguez-Arellano y col. 2016**). En el modelo EAE-STZ3, se observó un aumento en el número de astrocitos en el hipocampo y otras regiones del cerebro (**Rostami y col. 2017; Kraska y col. 2012; Dos Santos y col. 2018**). También se ha descripto en ratas una mayor inmunorreactividad de GFAP a diferentes tiempos post STZ-icv (**Bassani y col. 2017; Knezovic y col. 2017; Shi y col. 2017**). Por el contrario, otros trabajos no informaron cambios significativos en el contenido de GFAP en el hipocampo de ratas sometidas a STZ-icv (**Rodrigues y col. 2010; Biasibetti y col. 2013**).

Para intentar esclarecer estos hallazgos controversiales en el modelo STZ-icv, analizamos tres regiones del hipocampo dorsal distinguidas por participar en el aprendizaje y la memoria espacial: el SR de CA1, el DH del giro dentado y el SL de CA3. Nuestros resultados demuestran que STZ-icv tiende a aumentar el área GFAPir en el SR y DH; en particular, la dosis alta incrementó dicha área más del 100%. Este incremento fue significativo en la región SL. Este aumento de área GFAPir podría deberse a un incremento en el recuento celular o a hipertrofia celular. Dado que el recuento de células GFAPir fue similar para los tres grupos experimentales en las regiones hipocampales analizadas, la inyección de STZ no parece haber modificado este parámetro. Consecuentemente, sugerimos que los astrocitos

podrían haberse hipertrofiado. En línea con esta sugerencia, informes previos demostraron que los pacientes con EA muestran hiperreactividad de GFAP con signos de hipertrofia celular en el hipocampo (**Vijayan y col. 1991**) y en la corteza cerebral (**Colombo, Quinn y Puissant 2002**). Por otra parte, dado que se observó atrofia del hipocampo en ratas STZ3, se puede inferir que la densidad celular en SR, DH y SL está modificada, es decir, el mismo número de células GFAPir ocupa un menor volumen de parénquima cerebral en cerebros STZ3.

Cabe destacar que este es el primer trabajo en el que se analiza el efecto de dos dosis de STZ-icv sobre la morfología de los astrocitos. En relación a las ramificaciones de los astrocitos en el DH, no fue posible evaluar su complejidad debido a que la proximidad y la superposición de las células impidieron seleccionar una cantidad suficiente de células aisladas para realizar el análisis. Sin embargo, realizamos un análisis morfométrico detallado de astrocitos en el SR y el SL de ratas STZ-icv, mediante el análisis de Sholl. A nivel celular, STZ-icv promueve una disminución en la complejidad de los astrocitos, como se refleja en la reducción de la longitud de los procesos y en la menor complejidad de ramificaciones en ambas regiones del hipocampo, y una disminución del número de procesos primarios en el SR, lo que resulta en una menor arborización astrocitaria en las ratas STZ1 y STZ3 en comparación con las Sham. Tomando en consideración todos los parámetros, la complejidad de los astrocitos fue la única medida significativamente afectada para bajas dosis de STZ-icv. Respecto a este punto, en los cerebros post-mortem de pacientes con diagnóstico de demencia, se informó una disminución en la complejidad de astrocitos (**Senitz, Reichenbach y Smith 1995**). Consecuentemente, es concebible especular que la vulnerabilidad astrocitaria acompaña al inicio de la EA. Además, asumimos que estos astrocitos dañados no proporcionan una señal glía-neurona adecuada e inducen pérdida sináptica, lo que en efecto se observa en las primeras etapas de la EA y puede ser un factor determinante en el desarrollo de los déficits cognitivos.

Por último, se sugiere que la acumulación anormal de  $\beta$ A y p-Tau contribuye a la atrofia del hipocampo en el cerebro con EA (**Dhikav y Anand 2011; Irvine y col. 2008**). En estudios in vitro, se informó que la fosforilación del epítopo ser396 de Tau es responsable de la pérdida funcional de la polimerización de tubulina mediada por Tau (**Evans y col. 2000**). Respecto a esto, en el modelo STZ-icv se ha observado un aumento en la amiloidogénesis (**Salkovic-Petrisic y col. 2011**) y en la hiperfosforilación de Tau (**Grünblatt y col. 2007**). De acuerdo con estos estudios, hemos determinado, en el hipocampo del grupo STZ3, un aumento en los niveles de  $\beta$ A y p-Tau (ser396) y, una tendencia al aumento de la PPA, sin ningún cambio en los niveles totales de proteína Tau. Sin

embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de estas proteínas en el grupo STZ1. Por consiguiente, confirmamos la acumulación de  $\beta$ A y la tauopatía en el hipocampo del modelo STZ-icv en rata, 25 días después de la administración de STZ3.

## **CAPÍTULO V: TERAPIA CELULAR EN EL MODELO *IN VIVO* DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS (Objetivo específico 3)**

La obtención y caracterización de las MSCs estudiadas en el presente capítulo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires, en colaboración con la Dra. Mariana G. García y el Dr. Guillermo Mazzolini. Los experimentos de terapia celular en el modelo de EAE en rata se llevaron a cabo en nuestro Laboratorio, INIBIOLP, FCM - UNLP.

### **5.1 Reseña Introductoria**

La EA es la patología neurodegenerativa más prevalente en todo el mundo sin una terapia efectiva hasta la fecha. En este contexto, las MSCs constituyen un enfoque terapéutico prometedor para implementar medicina regenerativa, ya que han demostrado poseer actividades neurogénicas e inmunomoduladoras. Nuestra hipótesis es que la terapia de larga duración con MSCs tendría un efecto restaurador en el deterioro cognitivo característico de la EAE. En el presente estudio, utilizamos el modelo de EAE STZ-icv, validado en nuestro laboratorio (capítulo previo), para evaluar el potencial neuroprotector de las células perivasculares del cordón umbilical humano (hUCPVCs). El cordón umbilical representa una fuente ventajosa de MSCs debido a su disponibilidad inmediata y a su alta tasa de duplicación, evitando la necesidad de procedimientos invasivos y eliminando preocupaciones éticas. A partir de la administración crónica de hUCPVCs iv, una vía no invasiva, centramos nuestro análisis en el hipocampo de los animales, tanto a nivel funcional como morfológico.

### **5.2 Materiales y métodos**

#### **5.2.1 Animales**

Se utilizaron los animales y condiciones experimentales previamente descriptas en la **sección 4.2.1**. La aceptabilidad ética de nuestros protocolos animales fue aprobada por el CICUAL de la FCM, UNLP (P03-03-2016).

### 5.2.2 Aislamiento y caracterización de las hUCPVCs

Las hUCPVCs se aislaron de cordones umbilicales obtenidos de donantes sanos en el Hospital Universitario Austral (Pilar, Buenos Aires, Argentina) utilizando un protocolo (**Bayo y col. 2014**) adaptado de Sarugaser y col. 2005 (**Sarugaser y col. 2005**). Brevemente, se diseccionaron los cordones umbilicales y se retiraron los vasos con la gelatina de Warthon que los rodeaba. El tejido mesenquimal perivascular fue extirpado de los vasos y disgregado mecánicamente. Luego, se sembraron los fragmentos en DMEM completo bajo en glucosa con SFB al 20 % (Internegocios S.A., Argentina). Después de 7 días de incubación, se retiraron las células no adherentes y los fragmentos de tejido presentes. Las hUCPVCs adherentes se cultivaron y utilizaron entre los pasajes 4 a 6. Las MSCs se caracterizaron de acuerdo con las pautas de la ISCT (Dominici y col. 2006). Las características fenotípicas de las MSCs se determinaron mediante citometría de flujo con anticuerpos anti-humano específicos contra CD14, CD34, CD44, CD73, CD90 y CD105 (BD Biosciences), incubados durante 30 min. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson), y los datos adquiridos se analizaron con el software Cyflogic (CyFlo Ltd.) (**Donega y col. 2014**).

### 5.2.3 Inyecciones estereotáxicas e intravenosas

Para realizar las inyecciones estereotáxicas se procedió de manera similar a la previamente descripta para la fijación de las cánulas icv (**sección 4.2.2**); usando la misma anestesia, aparato estereotáxico y coordenadas icv. Para la terapia con MSCs, las ratas fueron inyectadas en la vena de la cola cada 18 días.

### 5.2.4 Comportamiento exploratorio y de ansiedad

El test de campo abierto (OF) consistió en una caja cuadrada (65 x 65 x 45 cm), cuyo piso se dividió en 16 cuadrados iguales. Las ratas se colocaron en el centro de la arena y se les permitió explorar libremente durante 5 min. Las variables de comportamiento fueron: **a. Grooming**: tiempo invertido por la rata en acicalarse, asearse o rascarse. **b. Líneas cruzadas**: número de líneas de la cuadrícula cruzadas por la rata con sus cuatro patas; **c. Entradas en área central**: frecuencia de entrada de la rata con sus cuatro patas al cuadrante central de la arena (**Figura 35.D**).

El test OF proporciona medidas simultáneas de locomoción, exploración y ansiedad (**Walsh y Cummins 1976**). El grooming es un comportamiento frecuente de los roedores en un entorno novedoso y se espera que disminuya con la exposición repetida a la arena, a medida que decrece la

ansiedad (**Espejo 1997**). El número de líneas cruzadas suele usarse como una medida de la actividad locomotora, pero también es una medida de exploración y ansiedad. Una alta frecuencia de este comportamiento indica un aumento de la locomoción y exploración y / o un menor nivel de ansiedad. El número de entradas en el cuadrado central es una medida del comportamiento exploratorio y ansioso. Una alta frecuencia de este parámetro indica un comportamiento exploratorio alto y niveles de ansiedad bajos (**Tatem y col. 2014; Dong y col. 2018**).

La arena abierta se limpió cuidadosamente con etanol al 10% después de cada prueba individual para eliminar las señales olfativas. El comportamiento se registró utilizando una videocámara conectada a una computadora y el rendimiento de cada individuo se determinó utilizando el software Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>).

### **5.2.5 Evaluación de la memoria espacial**

Se utilizó el protocolo del BM descripto previamente en la **sección 4.2.3**.

### **5.2.6 Comportamiento defensivo de enterramiento**

El test de enterramiento de canicas (Marble Burying, MB) se usa comúnmente para estimar el enterramiento defensivo en roedores (**De Boer y Koolhaas 2003**). Se basa en la observación de que los roedores entierran objetos expuestos en sus lechos, por ejemplo, canicas de vidrio. Las ratas fueron colocadas individualmente en una jaula de alojamiento (30 × 30 × 17 cm) con 5 cm de viruta de madera nueva. Dieciséis canicas de vidrio (1,5 cm de diámetro, dispuestas en un patrón de 4 × 4) fueron espaciadas uniformemente sobre la superficie (**Figura 37.B**). Se analizó el número de canicas enterradas durante un período de 30 min, considerando a una canica como enterrada si al menos 2/3 de la misma se hallaba cubierta con viruta (**De Boer y Koolhaas 2003**).

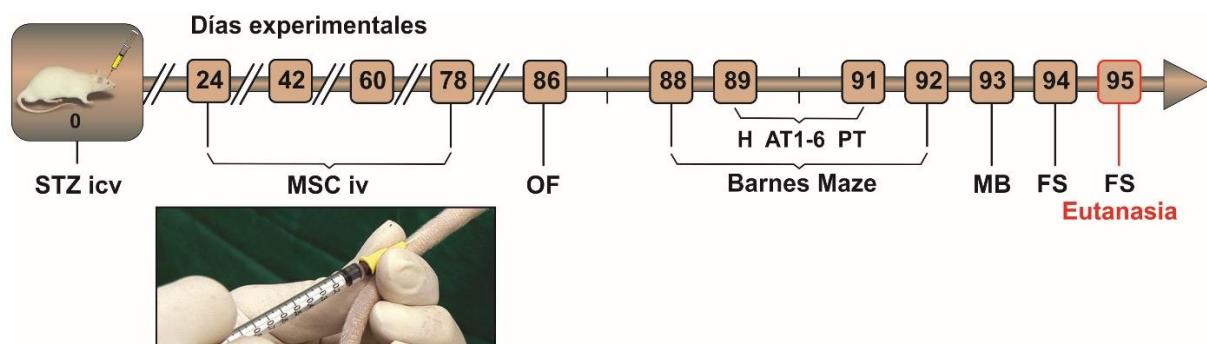
### **5.2.7 Comportamiento depresivo**

La evaluación del comportamiento depresivo se llevó a cabo mediante el test FS en un tanque de agua (27 °C) de 40 cm de profundidad y 30 cm de diámetro. El primer día, las ratas fueron expuestas individualmente al tanque de agua (**Figura 38.B**) durante 15 min (pre-test). Al día siguiente, se realizó una prueba de 5 min y se estimó el tiempo que cada animal destinó a nadar y trepar (conductas activas de escape) o flotar (conducta pasiva). Se utilizó una técnica de muestreo de tiempo para analizar los resultados, calificando el comportamiento predominante en intervalos de 5 s, durante la prueba de 300 s totales. Esto proporcionó un total de 60 puntuaciones (score). La disminución en la

conducta activa es característica de un comportamiento depresivo (**Detke, Rickels y Lucki 1995; Bogdanova y col. 2013**).

### 5.2.8 Diseño experimental

En el DEx 0, los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 7 animales cada uno: I- **Sham**, cada rata recibió una inyección icv bilateral (5  $\mu$ l/VL) de LCRA; II- **STZ** y III- **STZ+MSC**. Las ratas de los grupos II y III recibieron una inyección icv bilateral de STZ a una dosis de 3 mg/kg. En los días 24, 42, 60 y 78, el grupo III recibió una suspensión iv de 1 ml contenido 1x10<sup>6</sup> hUCPVCs en solución fisiológica. Para el protocolo del test OF, las ratas se colocaron individualmente en el centro de la arena abierta en el DEx 86, se les permitió explorarla durante 5 min y luego fueron devueltas a sus jaulas. En el DEx 88, las ratas se sometieron al protocolo del BM durante 5 días: habituación, 3 días con dos AT cada uno y PT (DEx 92). Al día siguiente, en el DEx 93, se realizó el test MB. En los DEx 94 y 95 los animales se sometieron al test FS. Finalmente, todas las ratas se sacrificaron durante el día 95 por rápida decapitación (**Figura 34**).



**Figura 34. Diseño experimental.** En el DEx 0, se inyectó mediante cirugía estereotáctica STZ-icv (3 mg/kg) o LCRA. En los días 24, 42, 60 y 78, el grupo STZ+MSC recibió 1x10<sup>6</sup> hUCPVCs iv. En el DEx 86, se realizó el test OF. La habituación del test BM se realizó el DEx 88; posteriormente, desde el DEx 89 al 91, los animales fueron sometidos a dos AT diarios de 120 s. El PT se realizó en el DEx 92. En los DEx 93 y 94, se realizaron el test MB y el pre-FS, respectivamente. El DEx 95 se llevó a cabo el test FS y, finalmente, la eutanasia de las ratas y el procesamiento de sus cerebros para análisis posteriores. Abreviaturas: AT, ensayo de adquisición; DEx, día experimental; FS, test de nado forzado; H, habituación; icv, intracerebroventricular; iv, vía intravenosa; LCRA, líquido cefalorraquídeo artificial; MB, test de enterramiento; OF, test de campo abierto; PT, ensayo de prueba.

### 5.2.9 Procesamiento de los cerebros, inmunohistoquímica y análisis de imágenes

El procesamiento de los cerebros, las técnicas de IHQ y los análisis de imágenes se realizaron como se describió previamente en las **secciones 3.2.7 a 3.2.9 y 4.2.6 a 4.2.8**.

### **5.2.10 Análisis estereológicos en el hipocampo dorsal**

La evaluación del volumen del *SR*, neuroblastos, neuronas maduras y células microgliales y astrogliales se realizaron como se describió previamente en las *secciones 3.2.10 a 3.2.11 y 4.2.9 a 4.2.12*.

### **5.2.11 Análisis de Western Blot**

La preparación de las muestras, cuantificación proteica, inmunotransferencia y análisis semicuantitativo se realizó como se describió previamente en la *sección 3.2.12*. Cada muestra, conteniendo igual cantidad de proteínas (50 µg), transferidas a membranas de nitrocelulosa, fue incubada con anticuerpos primarios contra SYT1 (1:200; mAb 48 (asv 48), DSHB), sinaptotagmina 2 (SYT2) (1:150; Znp-1, DSHB), SYP (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-17750), proteína de vesícula sináptica 2 (SV2) (1:200; SV2, DSHB), ácido glutámico decarboxilasa (GAD) (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-365180), en sus isoformas GAD65 y 67, VIN (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-73614), y β-Actina (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, sc-47778). Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente anti-ratón HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-003) o anti-conejo HRP (1:5000, Thermo Fisher Scientific, 32460). Se usó VIN como control de carga por muestra para SYP y SYT1, y β-actina como control de carga por muestra para SYT2, SV2, GAD65 y GAD67.

### **5.2.12 Análisis estadístico**

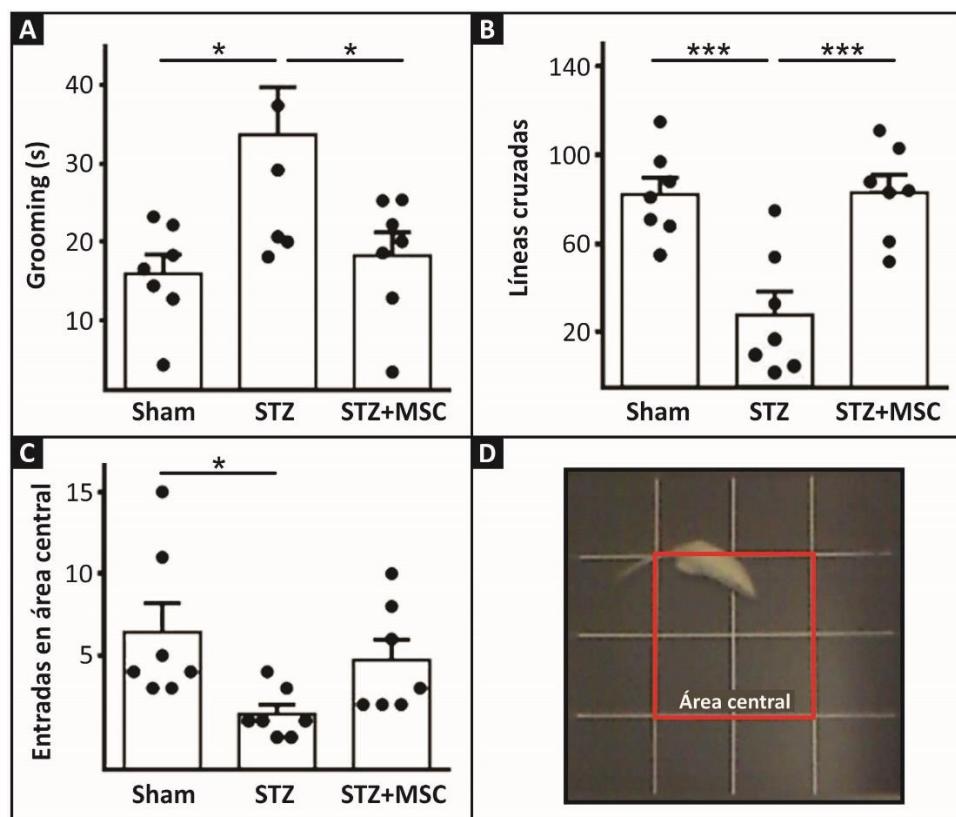
Los datos de comportamiento, estereológicos y de WB se analizaron como se describió previamente en la *sección 4.2.14*. Para analizar las correlaciones se utilizó la prueba de correlación de Pearson. Todos los datos se representaron como media ± SEM y se estimaron utilizando el software *GraphPad Prism 6*. (Graph-Pad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Se consideraron diferencias significativas a valores de  $P < 0,05$ .

## **5.3 Resultados**

### **5.3.1. Restauración del comportamiento exploratorio y la ansiedad**

El test OF es un procedimiento ampliamente utilizado para examinar efectos de tratamientos en el comportamiento exploratorio y la ansiedad. En nuestro análisis, la inyección de STZ provocó un

aumento en el grooming (**Figura 35.A.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0147$ ) y una disminución en el número de líneas cruzadas (**Figura 35.B.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0003$ ), los cuales fueron revertidos con el tratamiento con MSCs. Además, la administración de STZ condujo a una disminución notable en el número de entradas al área central (**Figura 35.C.** ANOVA de una vía,  $P = 0,0403$ ), la terapia mostró inducir una tendencia a normalizar este parámetro. Por tanto, la terapia tuvo un efecto supresor de la ansiedad inducida por la STZ-icv en el test OF.

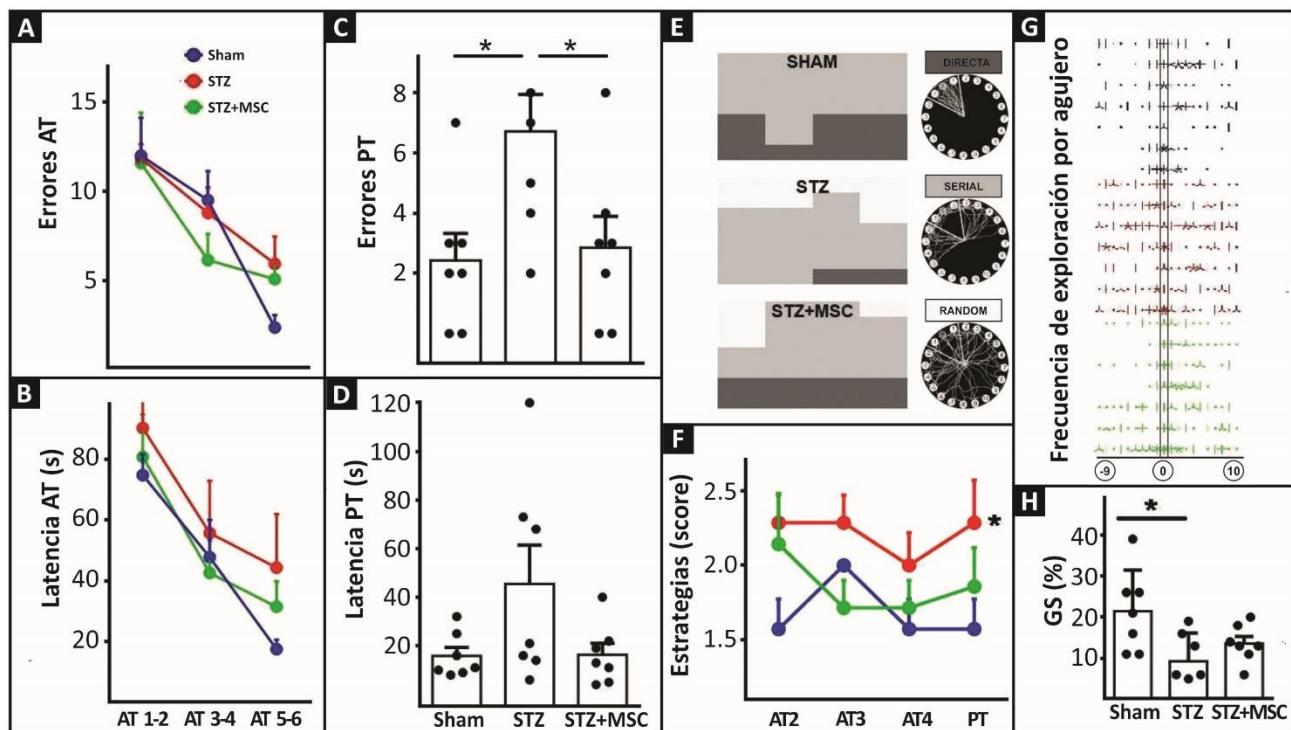


**Figura 35. Efecto de la terapia MSCs sobre el comportamiento en el test de campo abierto (OF).** Durante el OF, las ratas tratadas con STZ mostraron un aumento significativo en el grooming (A), junto con una reducción en las líneas cruzadas (B) y en las entradas al área central (C). La terapia celular restableció los primeros dos parámetros a valores normales, pero no así las entradas.  $N = 7$  por grupo. Los datos se representaron como media  $\pm$  SEM. Se realizaron comparaciones entre los grupos. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 5.3.2. Restauración del aprendizaje y la memoria espacial

Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo, se realizó el test BM. El grupo STZ mostró un rendimiento deficiente en el aprendizaje que fue atenuado con la terapia celular, evidenciado por una disminución en los errores y en el tiempo en encontrar el agujero meta (**Figura 36.A-B.** ANOVA de dos vías,  $P = 0,7229$  y  $P = 0,4837$ , respectivamente). Con respecto a la evaluación de la memoria en el PT, el grupo STZ cometió más errores que el Sham, mientras que para

el grupo STZ+MSC se registraron significativamente menos errores (**Figura 36.C**. ANOVA de una vía,  $P = 0,0194$ ). Se observó una tendencia a aumentar la latencia en el PT en los animales con STZ3, mientras que la latencia para los grupos Sham y STZ+MSC fue la misma (**Figura 36.D**. ANOVA de una vía,  $P = 0,0779$ ). Además, analizamos las estrategias de escape de los animales en el segundo AT de cada día experimental. El grupo Sham evidenció preferencia por la estrategia directa mientras que las ratas STZ se inclinaron por la estrategia aleatoria (random), como se muestra en los gráficos de proporciones y de líneas de puntuación (score) para las estrategias (**Figuras 36.E-F**, respectivamente). La terapia celular logró que las ratas con STZ se inclinen significativamente hacia estrategias de búsqueda más efectivas (**Figura 36.F**. ANOVA de dos vías,  $P = 0,0326$ ). Con el fin de generar una representación clara del número de exploraciones por agujero de cada animal durante el PT, construimos un diagrama de girasol donde observamos que los individuos STZ exploraron todos los agujeros mayormente al azar; este comportamiento no se observó de igual manera en el grupo STZ+MSC, ya que los animales tendieron a explorar más el sector meta (**Figura 36.G**). Precisamente, el tratamiento con STZ provocó una disminución en el porcentaje de exploración en el GS y el grupo STZ+MSC mostró una tendencia al incremento de este parámetro en comparación con el grupo STZ (**Figura 36.H**. ANOVA de una vía,  $P = 0,0276$ ).

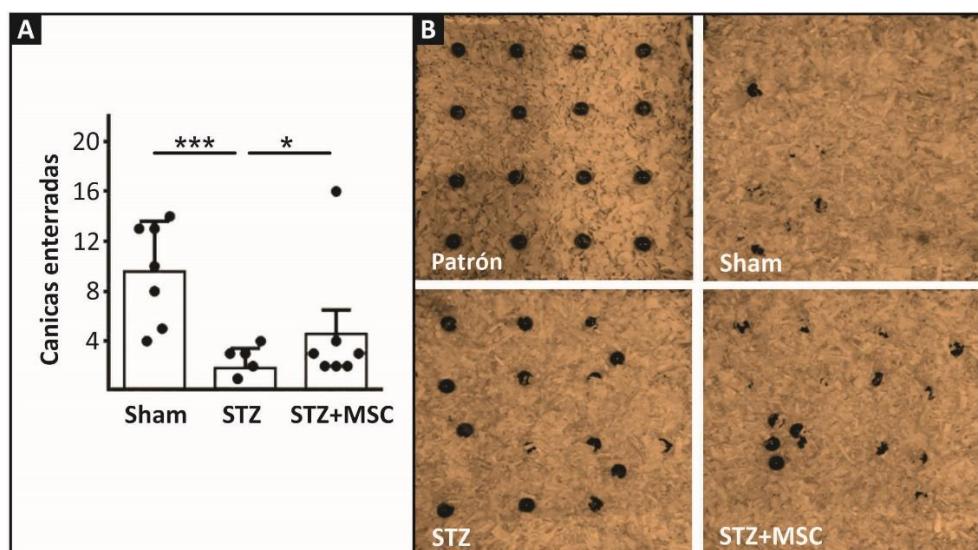


**Figura 36. Análisis del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto de Barnes (BM).** Errores y latencia a la caja de escape en los AT (A y B, respectivamente) y PT (C y D, respectivamente). Se observó un aumento en el número de errores cometidos por los animales STZ durante el PT y una disminución en el grupo STZ+MSC

(C), aunque no hubo diferencias durante el aprendizaje (A). Con respecto a la latencia (B y D), no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Representación esquemática del laberinto y de las estrategias de búsqueda: directa, serial y aleatoria (random) (E). El grupo Sham evidenció preferencia por la estrategia directa mientras que las ratas STZ mostraron un incremento significativo de la estrategia aleatoria, es decir, un aumento en la puntuación (score) (F); la terapia impulsó a los animales al cambio hacia la estrategia serial y directa. El diagrama de girasol representa la frecuencia de exploración de los agujeros en el PT (G). El tratamiento STZ provocó una disminución en el porcentaje de frecuencia de exploración del GS en el PT (H), mientras que el grupo STZ+MSC mostró una tendencia a incrementar este parámetro. Abreviaturas: AT, ensayo de adquisición; GS, sector meta; PT, ensayo de prueba. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. N = 7 por grupo. \* P < 0,05.

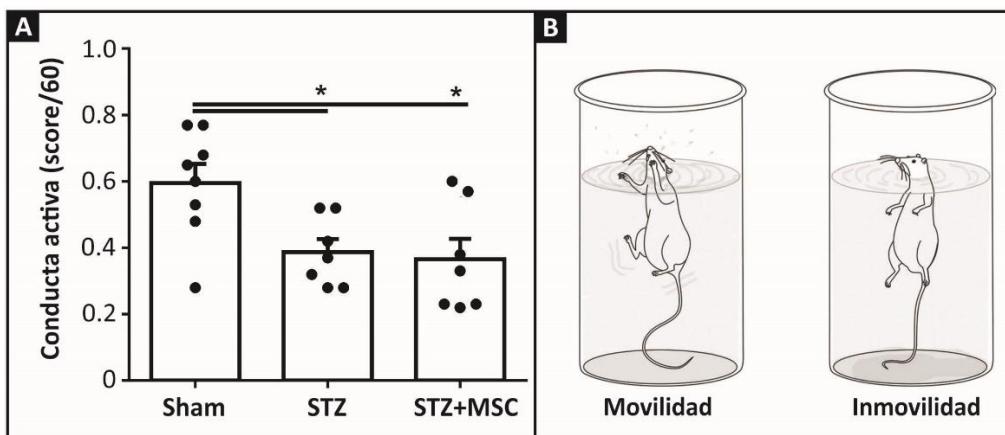
### 5.3.3. Evaluación del comportamiento innato de enterramiento defensivo y del comportamiento depresivo

En el test MB, el grupo STZ enterró menos canicas mostrando una alteración del comportamiento innato de enterramiento defensivo. La terapia con MSCs, logró revertir el déficit en parámetro alcanzando valores normales (Figura 37.A. ANOVA de una vía, P = 0,0004).



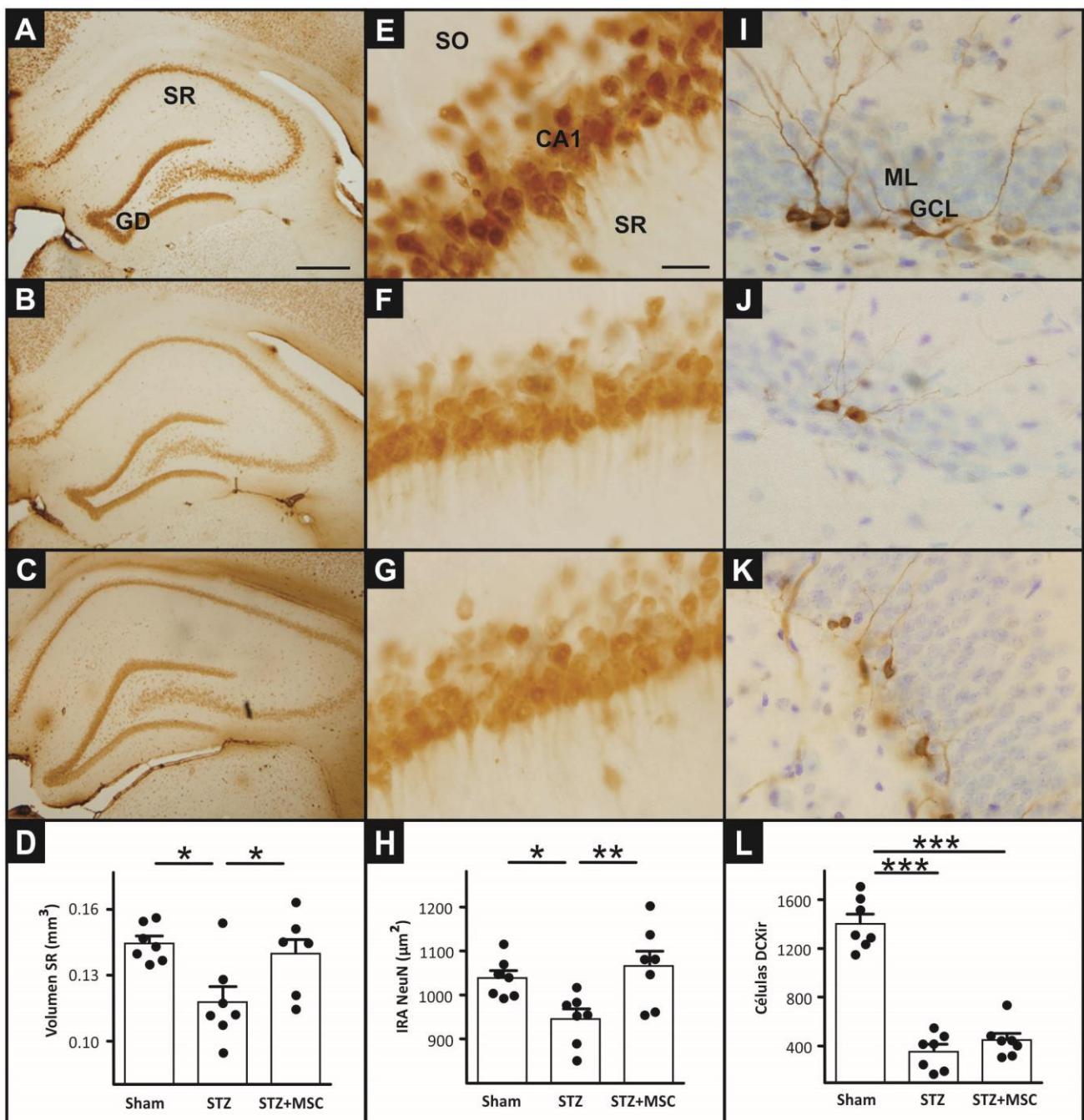
**Figura 37. Evaluación del comportamiento en el test de enterramiento defensivo.** Se observó que la terapia celular causa un aumento significativo en el número de canicas enterradas (A), un parámetro previamente afectado por STZ. Patrón de canicas (4 x 4) e imágenes del test BM, representativa de cada grupo experimental (B). N = 7 por grupo. Los datos se representaron como media  $\pm$  SEM. Se realizaron comparaciones entre grupos. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,001.

Por otra parte, la administración de STZ produjo una disminución significativa de la conducta activa en el test FS, indicando un comportamiento depresivo, el cual no mostró mejoría en el grupo STZ+MSC (Figura 38.A. ANOVA de una vía, P = 0,0116).



#### 5.3.4. Evaluación de volumen, las neuronas maduras y la neurogénesis en el hipocampo

El proceso patológico de la EAE implica cambios en el volumen y la histología neuronal del hipocampo. Por lo tanto, examinamos el volumen del SR y las poblaciones de neuronas maduras e inmaduras del hipocampo. El tratamiento con STZ provocó una disminución notable en el volumen de SR, que fue revertido con la terapia MSCs (Figura 39.A-D. ANOVA de una vía, P = 0,01). Se observó un resultado similar para el IRA de las neuronas NeuN en CA1 (Figura 39.E-H. ANOVA de una vía, P = 0,0089). El análisis de neuroblastos DCXir reveló que la terapia celular no pudo restaurar la dramática disminución de la neurogénesis en el GD inducida por la inyección de STZ (Figura 39.I-L. ANOVA de una vía, P < 0,0001).



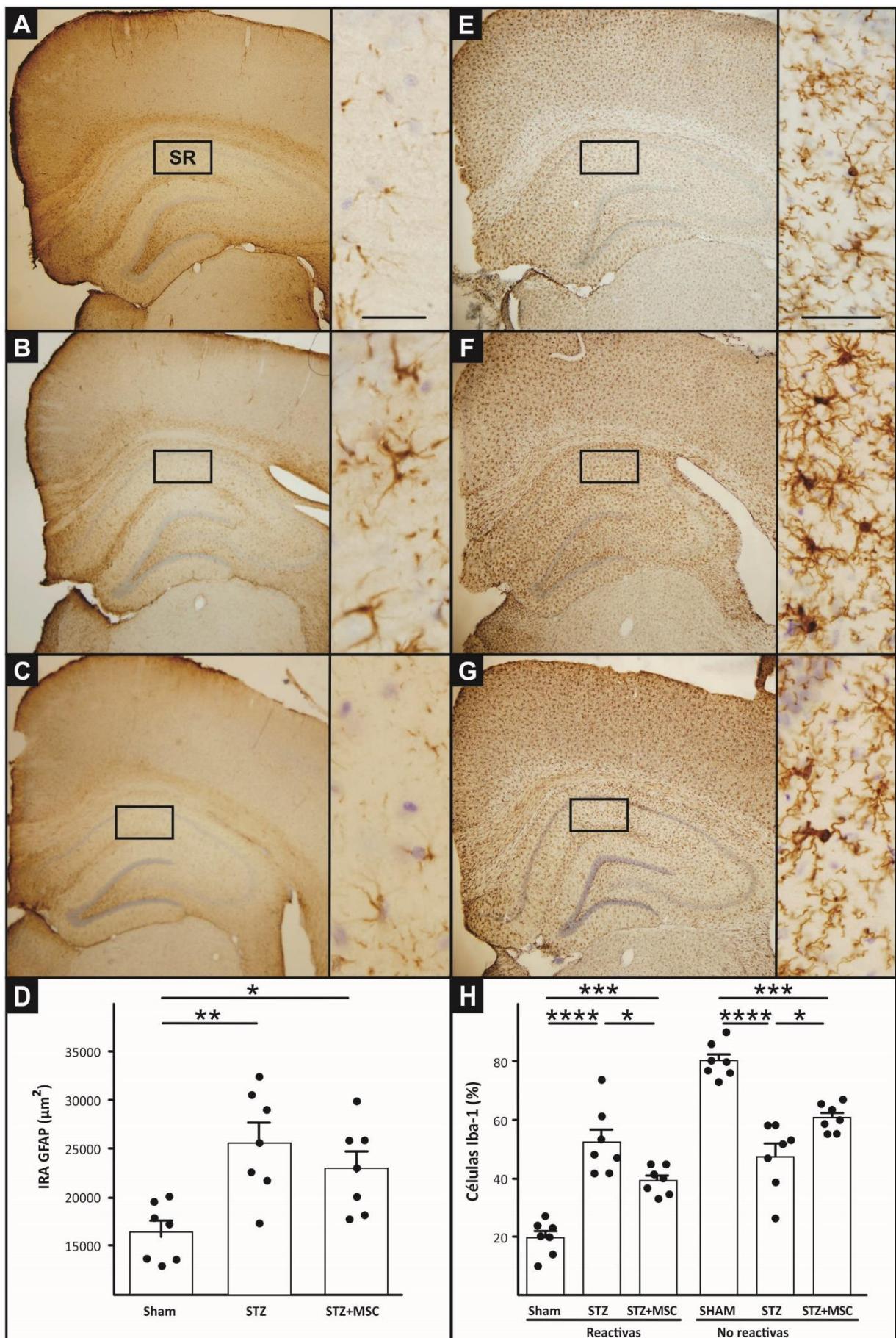
**Figura 39. Análisis morfométrico del volumen del *Stratum Radiatum*, de neuronas maduras en CA1 y de neuroblastos en el giro dentado.** Secciones coronales del SR en animales representativos de cada grupo que muestran células NeuNir (A-C, 40 X; E-G, 1000 X). Cuantificación del volumen de SR que muestra un proceso atrófico del hipocampo en el grupo tratado con STZ y una mejora con el tratamiento con MSCs (D). Se observó una reducción en el IRA de NeuN en la capa piramidal CA1 del hipocampo en el grupo STZ que se revirtió con la terapia celular (H). Expresión de DCX en el GD de animales representativos de cada grupo (I-K). El número de células DCXir se grafica en L, evidenciando una fuerte caída en los grupos STZ y STZ+MSC. Abreviaturas: CA1, *Cornus Ammoni 1*; DCXir, doblecortina inmunoreactiva; GD, giro dentado; GCL, capa celular granular; IRA, área inmunorreactiva; ML, capa molecular; SO, *Stratum Oriens*; SR, *Stratum Radiatum*. Barra de escala 250 µm (A) y 25 µm (E). N = 7 por grupo. Los datos se representaron como media ± SEM. Se realizaron comparaciones entre grupos. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

### 5.3.5. Cambios en la microgliosis y la astrogliosis en el hipocampo

Para evaluar el efecto inmunomodulador de las MSCs en el hipocampo, estudiamos las células microgliales y astrogliales. Confirmamos que la inyección de STZ produjo una gliosis notoria. La evaluación del IRA de GFAP mostró un gran aumento en el grupo STZ; esta astrogliosis no pudo revertirse con la terapia celular (**Figura 40.A-D.** ANOVA de una vía,  $P < 0,0001$ ). Para investigar si la causa de este incremento del IRA fue hiperplasia o hipertrofia, estimamos el número de células GFAPir. No se encontraron diferencias significativas respecto al número de astrocitos GFAPir en los grupos experimentales (datos no mostrados. ANOVA de una vía,  $P = 0,1983$ ), lo cual sugiere que el mecanismo probable de la astrogliosis fue hipertrofia, en lugar de hiperplasia.

Además, en el análisis Sholl del SR no se registraron diferencias en la complejidad de las ramificaciones, en la longitud media de los procesos astrocíticos, ni en el número de procesos que emergen desde el soma celular (datos no mostrados. ANOVA de dos vías,  $P = 0,3311$ ;  $P = 0,2807$  y;  $P = 0,3947$ , respectivamente). Este resultado indica que 3 meses después de la administración de STZ-icv se conservaron las ramificaciones astrocíticas completas.

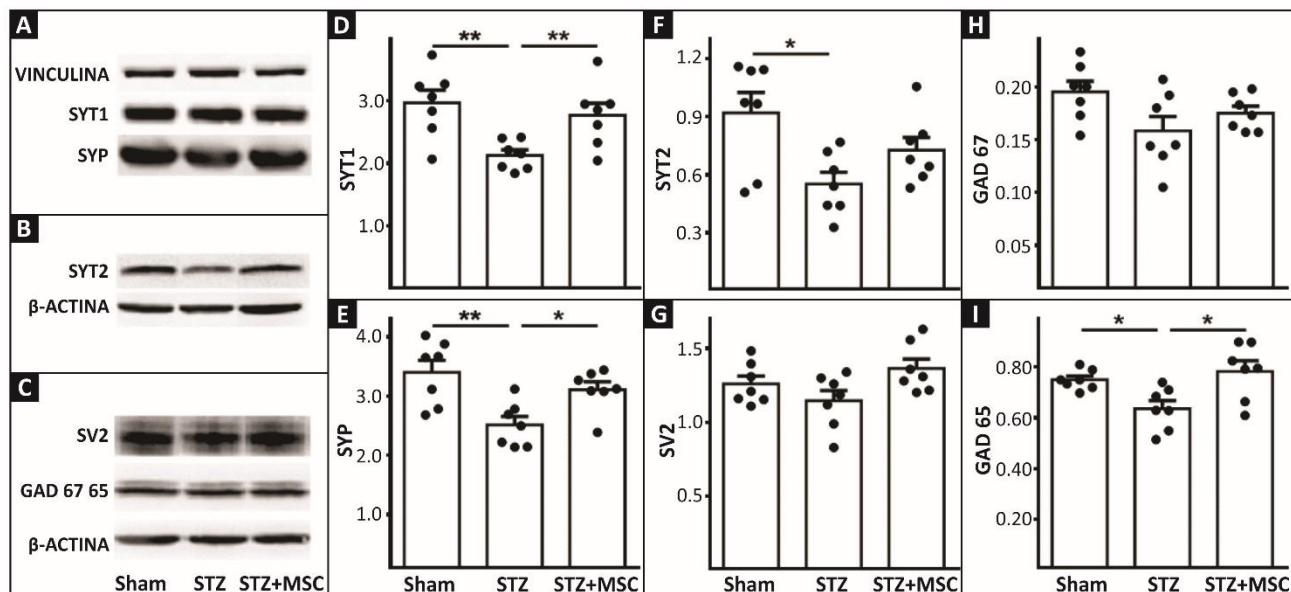
Por medio de la inmunomarcación con Iba-1 en el hipocampo, registramos un aumento importante en el número total de células Iba-1ir en los grupos STZ y STZ+MSC (datos no mostrados. ANOVA de una vía,  $P = 0,0008$ ). Cuando evaluamos la morfología de las células, como se esperaba, STZ mostró un aumento significativo en el porcentaje de microglía reactiva junto con una disminución de microglía no reactiva; estas alteraciones inducidas por la STZ fueron mejoradas con la terapia celular (**Figura 40.E-H.** ANOVA de una vía,  $P < 0,0001$ ).



**Figura 40. Efecto de la terapia MSCs en astrocitos y microglía en el *Stratum Radiatum* hipocampal.** Imágenes del hipocampo representativas de los grupos Sham (A y E), STZ (B y F) y STZ+MSC (C y G), que muestran células GFAPir (A-C, 40X; a la derecha: microfotografía magnificada, 1000X) e Iba-1ir (E-G, 40X; a la derecha: microfotografía magnificada, 600X). La cuantificación del IRA de GFAP mostró un gran aumento en el grupo STZ que no logró ser revertido con la terapia MSCs (D). Análisis del porcentaje de células Iba-1 reactivas y no reactivas (H); se observó un aumento dramático en las células reactivas de Iba-1 en el grupo de STZ y una disminución significativa con la terapia celular. Por el contrario, las células Iba-1 no reactivas muestran una disminución en el grupo STZ y niveles mayores en el grupo STZ+MSC. Abreviaturas: IRA, área inmunoreactiva; SR, *Stratum Radiatum*. Barra de escala 50  $\mu$ m (A y E). N = 7 por grupo. Los datos se representaron como media  $\pm$  SEM. Se realizaron comparaciones entre grupos. \* P <0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P <0,001; \*\*\*\* P <0,0001.

### 5.3.6. Niveles de proteínas sinápticas en el hipocampo

Analizamos si la administración de MSCs favorece la señalización sináptica en el hipocampo de los animales del modelo de EAE. El grupo STZ mostró una reducción significativa en los niveles de las proteínas SYT1 (Figura 41.D), SYP (Figura 41.E) y GAD 65 (Figura 41.I), que fue revertida por la terapia celular (ANOVA de una vía, P = 0,0067; P = 0,0036 y; P = 0,01, respectivamente). El nivel de proteína SYT2 también mostró una disminución en las ratas STZ que con tratamiento celular tendió a aumentar (Figura 41.F. ANOVA de una vía, P = 0,015). No encontramos diferencias significativas en los niveles proteicos de SV2 y GAD67 (Figura 41.G-H. ANOVA de una vía, P = 0,0696 y P = 0,0772, respectivamente).

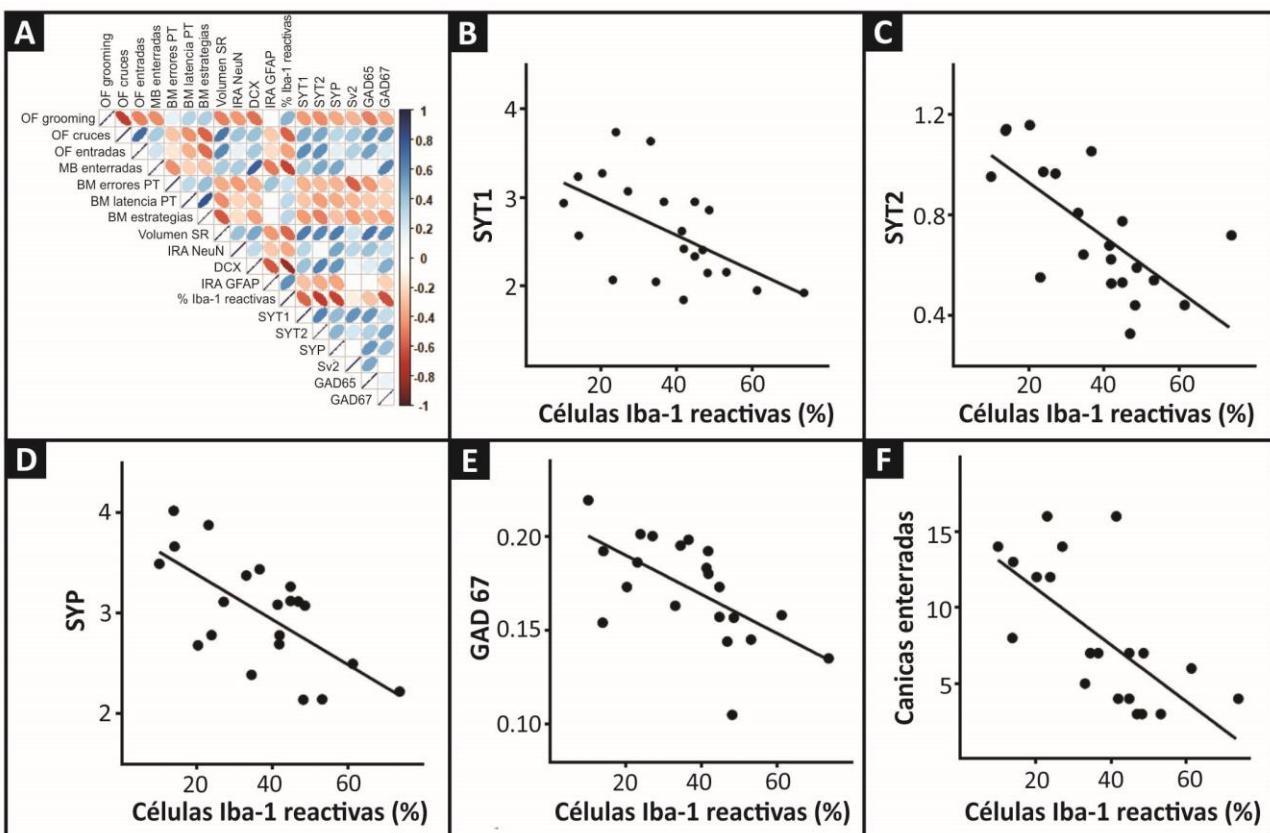


**Figura 41. Efecto de la terapia con MSCs en los niveles hipocampales de proteínas sinápticas.** Western Blot de VIN, SYT1 y SYP (A); SYT2 y β-Actina (B); SV2, GAD 67, GAD 65 y β-Actina (C), para cada grupo experimental. Cuantificación de los niveles de SYT1 (D), SYP (E), SYT2 (F), SV2 (G), GAD67 (H) y GAD 65 (I), normalizados a la densidad relativa de VIN (D-E) o β-actina (F-I), según se muestra en A, B y C. Se observó una disminución significativa en SYT1, SYT2, SYP y GAD65 para el grupo de STZ, mientras que la terapia celular restauró los

niveles de SYT1, SYP y GAD65. Abreviaturas: *GAD*, ácido glutámico decarboxilasa; *SV2*, proteína 2 de la vesícula sináptica; *SYP*, sinaptofisina; *SYT*, synaptotagmin; *VIN*, vinculina. N = 7 por grupo. Los datos se representaron como media ± SEM. Se realizaron comparaciones entre grupos. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

### 5.3.7. Identificación de correlaciones entre comportamiento, morfología y expresión de proteínas sinápticas en el hipocampo

Por último, con el fin buscar conexiones causales entre la función sináptica, la morfología hipocampal y el comportamiento de las ratas evaluadas en las diferentes condiciones experimentales, construimos una matriz de correlación para integrar nuestro análisis de datos (**Figura 42.A**). Como se esperaba, encontramos una correlación positiva entre el número de líneas cruzadas y de entradas al área central en el test OF, junto con una correlación negativa entre líneas cruzadas y grooming. A nivel morfológico, hallamos una correlación prevista entre astrogliosis y microgliosis. También observamos correlaciones positivas entre el volumen de SR y las líneas cruzadas, y entre las entradas en el test OF y la expresión de proteínas sinápticas (SYT1, SYT2, SYP, GAD65 y GAD67). Resulta de interés que encontramos una correlación negativa significativa entre la microglía reactiva y la expresión proteica de SYT1 (**Figura 42.B**,  $r = -0,5688$ ,  $P = 0,0071$ ), SYT2 (**Figura 42.C**,  $r = -0,6909$ ,  $P = 0,0005$ ), SYP (**Figura 42.D**,  $r = -0,6689$ ,  $P = 0,0005$ ), GAD67 (**Figura 42.E**,  $r = -0,6218$ ,  $P = 0,0026$ ), y con las canicas enterradas en el test MB (**Figura 42.F**,  $r = -0,6682$ ,  $P = 0,0009$ ).



**Figura 42. Correlación entre los distintos parámetros estudiados y en particular las correlaciones con la microglía reactiva.** Matriz de correlación para todos los resultados experimentales (A). Los óvalos más delgados y oscuros indican una fuerte correlación positiva (azul) o negativa (roja). Se observa una correlación negativa significativa entre la microglía reactiva y la expresión de las proteínas sinápticas: SYT1 (B), SYT2 (C), SYP (D), GAD67 (E), y con el comportamiento de enterramiento (F). Abreviaturas: GAD, ácido glutámico decarboxilasa; SYP, sinaptofisina; SYT, sinaptotagmina. N = 7 por grupo.

#### 5.4. Discusión

En el presente estudio, utilizamos la inyección de STZ-icv en ratas, un modelo ampliamente aceptado debido a su capacidad de reproducir varias características patológicas y de comportamiento que ocurren en la EA. Dicho modelo fue validado previamente por nosotros (**capítulo IV**) y otros (**Zappa Villar y col. 2018; Blokland y Jolles 1993b; Salkovic-Petrisic y col. 2009; Rostami y col. 2017**).

Hasta el momento, la administración de MSCs en el modelo STZ-icv en rata ha sido poco investigada (**Isik y col. 2016; Mohammadi y col. 2018**). En el presente capítulo, evaluamos la efectividad de un método de administración no invasivo, basados en el estudio de **Panchenko y col.** en el que se informó que las MSCs pueden llegar al cerebro mediante inyecciones iv en un modelo de neurodegeneración de tipo Alzheimer (**Panchenko y col. 2014**). Como describimos previamente en

el **capítulo III**, se ha demostrado que distintas estrategias de administración intracerebral de MSCs en modelos animales con trastornos neurodegenerativos, además de la EA, mejoran los déficits cognitivos (**Cho y col. 2006; Bantubungi y col. 2008**). A pesar de las diferencias en las fuentes de células madre y en el paradigma de inyección utilizados, resulta particularmente interesante que nuestro tratamiento con hUCPVCs-iv logró mejorar los cambios de comportamiento y neurodegenerativos a los 3 meses posteriores a la inyección de STZ en ratas.

La tendencia natural de los animales en un nuevo entorno es explorarlo, tal como en el test de campo abierto. En línea con los hallazgos anteriores que demostraron una disminución del comportamiento exploratorio y ansioso en este modelo (**Hosseinzadeh y col. 2015; Fedotova y col. 2016**), las ratas que recibieron STZ presentaron un mayor tiempo de grooming y una menor actividad de cruce, lo que indica un comportamiento de mayor ansiedad y de menor exploración. En concordancia, observamos un aumento de la ansiedad reflejado por el menor número de entradas en el área central. Las ratas que recibieron MSCs mejoraron estos parámetros, siendo similares a los del grupo control, corroborando así el efecto beneficioso ejercido por la terapia hUCPVCs contra el deterioro de la conducta de exploración y la ansiedad. Vale la pena señalar que, como se mencionó previamente en el **capítulo IV**, hemos evaluado con anterioridad el rendimiento motor y, de acuerdo con estudios previos (**Ozkay y col. 2012; Saxena, Patro y Nath 2011; Bokare y col. 2018**), no encontramos diferencias significativas en los animales STZ-icv (**Zappa Villar y col. 2018**).

Las ratas de laboratorio muestran normalmente un enterramiento innato-defensivo de objetos desconocidos colocados en sus jaulas, y este comportamiento es considerado como una respuesta apropiada, ya que elimina la fuente del estímulo aversivo. Alternativamente, se ha postulado que el comportamiento de enterramiento es gratificante o compulsivo (**Njung'e y Handley 1991; Broekkamp 1989; Thomas y col. 2009**). Los resultados informados anteriormente mostraron que ratones transgénicos de EA (Tg-APP / PS1) enterraron menos canicas que los no transgénicos (**Kim y col. 2012**). En nuestro estudio, se realizó el test MB para evaluar el efecto de las hUCPVCs en dicho comportamiento defensivo en ratas expuestas a STZ-icv. Los resultados demostraron que la STZ conduce a una disminución del enterramiento, mientras que la terapia celular restauró significativamente este comportamiento, lo que sugiere que las ratas STZ+MSC pueden tener un umbral defensivo más bajo para tales estímulos desconocidos, similares a los del grupo de control. El importante papel de la disfunción hipocampal en el desarrollo de la EAE en ratas STZ-icv se discutió en el **capítulo IV** y en artículos recientes (**Zappa Villar y col. 2018; Salkovic-Petrisic y col. 2013; Grieb**

2016). Asimismo, hay evidencia que sustenta la contribución del hipocampo en control del comportamiento defensivo en roedores (Dringenberg, Levine y Menard 2008). Por lo tanto, resulta plausible postular que el efecto benéfico de las MSCs atenúa la disfunción hipocampal involucrada en el comportamiento de enterramiento aberrante (Deacon y Rawlins 2005).

Observamos que, 3 meses después de la inyección de STZ-icv, las ratas no revelaron un deterioro del aprendizaje espacial, al menos bajo el protocolo de BM llevado a cabo en nuestro estudio. Por el contrario, estos animales si mostraron tener deteriorada la memoria espacial, dado que en el PT cometieron más errores y mostraron una tendencia de aumento de la latencia. Estos resultados son consistentes con nuestro trabajo previo (*capítulo IV*) realizado un mes después de la STZ-icv (Zappa Villar y col. 2018), y también con los déficits de memoria espacial observados por otros autores en el MWM (Guo y col. 2017; Salkovic-Petrisic y col. 2015).

Los resultados del presente capítulo demostraron que el tratamiento con hUCPVCs logró mejorar el déficit de memoria, inducido por la STZ, evaluado en el PT. Además, observamos que los animales que recibieron la terapia con MSCs mostraron una propensión a elegir estrategias de búsqueda más eficientes a lo largo de los AT y PT (es decir, un menor uso de la estrategia de búsqueda aleatoria) y una mejoría en la retención de la memoria durante el PT, dos componentes que contribuyen a la magnitud de la frecuencia exploratoria en el agujero meta.

Varios estudios han propuesto que el volumen y la pérdida neuronal en CA1 del hipocampo, son características tempranas de la EA, y están fuertemente correlacionadas con el estado cognitivo (Zappa Villar y col. 2018; Su y col. 2018; Bobinski y col. 1998; Elgh y col. 2006; Stoub y col. 2006). Previamente, se observó que la STZ a los 21 días inducía neurodegeneración en el hipocampo, particularmente en el área CA1 (Majkutewicz y col. 2016). En el *capítulo IV*, de manera similar, observamos una disminución en la inmunomarcación de NeuN en ratas STZ y sugerimos su relación con la muerte neuronal en el hipocampo dorsal (Zappa Villar y col. 2018). En el presente trabajo, nuestros resultados muestran que la STZ-icv a 3 meses induce una reducción del volumen del SR y una pérdida de neuronas piramidales en CA1. Como esperábamos, la terapia hUCPVCs restauró tanto el volumen como la pérdida de neuronas evaluados en el hipocampo. Además, determinamos que el volumen del SR se correlaciona positivamente con las líneas cruzadas y las entradas al área central en el OF, y negativamente con la preferencia por la estrategia aleatoria, lo que sugiere que el impacto de la terapia en el comportamiento exploratorio podría estar mediado por la restauración del

volumen del hipocampo. Es probable que la señalización paracrina de hUCPVCs esté involucrada en la recuperación de la atrofia estructural del SR y CA1 que conlleva a la neurodegeneración del hipocampo y al deterioro cognitivo inducidos por la STZ.

El nicho de neurogénesis adulta en el GD es susceptible al deterioro por varios factores, tales como el envejecimiento y la EA (**Pardo y col. 2016; Lazarov y Marr 2010**). En este sentido, la inyección de STZ induce una disminución marcada en la tasa de neurogénesis, como se ha observado previamente (**Sun y col. 2015; Bassani y col. 2018**). Además, nuestros datos muestran una correlación negativa notable entre el número de neuroblastos y la microgliosis. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la neuroinflamación tiene un efecto perjudicial sobre la neurogénesis, y tanto la neuroinflamación como las alteraciones en la neurogénesis contribuyen a los déficits cognitivos en el modelo STZ-icv de EAE (**Bassani y col. 2018**).

Resulta importante destacar aquí que estudios anteriores de nuestro grupo describieron que la disminución de DCXir en el GD relacionada con la edad pueden restaurarse por la sobreexpresión de IGF-1 (**Pardo y col. 2018**). En esta línea, planteamos la hipótesis de que los factores de crecimiento secretados por las MSCs podrían tener un efecto positivo sobre los neuroblastos. Sin embargo, no resultó ser el caso ya que el análisis morfométrico reveló que la terapia celular no tuvo un efecto beneficioso sobre el recuento de neuroblastos DCXir. Consecuentemente, dado que la terapia con MSCs mejoró el comportamiento en el OF, LB y MB, pero no se evidenció una mejora en la neurogénesis, sugerimos que este proceso fisiológico no tendría un rol relevante en los comportamientos analizados.

Se ha establecido fehacientemente que la neuroinflamación desempeña un papel importante en la EA (**Bronzuoli y col. 2016; Spengenberg y Green 2017; Medeiros y LaFerla 2013**). En el SNC, los astrocitos y las células microgliales se activan a menudo en enfermedades neurodegenerativas. Como se mencionó anteriormente, la STZ-icv provocó un aumento notable de la gliosis hipocampal, en concordancia con estudios previos a diferentes tiempos post STZ (**Zappa Villar y col. 2018; Kraska y col. 2012; Weinstock y Shoham 2004; Rodrigues y col. 2010**), y, además, esta gliosis parece contribuir con los déficits cognitivos observados en el modelo EAE en rata (**Bassani y col. 2018**).

Si bien la terapia hUCPVCs no ejerció un efecto modulador de la astrogliosis pronunciado, registramos una disminución interesante de la microgliosis. Cabe destacar que esta caída no alcanzó los niveles del grupo Sham, lo cual abre la discusión sobre si dicha disminución cuantitativa, pero no

restaurativa, es suficiente para restablecer la función cognitiva y sináptica en el modelo STZ. Estudios adicionales son necesarios para esclarecer este punto.

El efecto benéfico de las MSCs podría estar mediado por sus propiedades inmunorreguladoras y regenerativas (**Katarina Le Blanc y Mougiakakos 2012; Lin y col. 2017; Drommelschmidt y col. 2017**). Ciertamente, se reportó que dichas células pueden mantener el fenotipo en reposo o controlar la activación microglial mediante la producción de diversos factores, lo que sugiere que las MSCs podrían ser una herramienta terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades asociadas con la microgliosis (**Yan y col. 2013**).

Se ha comprobado que la pérdida sináptica, ampliamente caracterizada en la EA, posee una importante asociación con el deterioro cognitivo (**Terry y col. 1991**), lo que sugiere un papel causal para la disminución de la integridad sináptica en la etiología de la enfermedad (**Forner y col. 2017; Sze y col. 1997**). El presente estudio reveló una disminución en la expresión de proteínas presinápticas en el hipocampo de los animales STZ y el tratamiento con hUCPVCs restauró los niveles de la mayoría de estas proteínas (SYT1, SYP y GAD65), lo que indica que la terapia celular con hUCPVCs confiere protección contra la desregulación sináptica inducida por la STZ-icv. Aunque el mecanismo específico aún se desconoce, probablemente la disminución de la expresión de las proteínas presinápticas en el grupo STZ afecta la liberación de neurotransmisores, dificultando así las funciones fisiológicas de las neuronas (**Sze y col. 1997; Zhang y col. 2013; Schwab y col. 2013**). Conjuntamente, determinamos que el volumen del hipocampo correlaciona positivamente con la expresión de las proteínas sinápticas evaluadas. Al respecto, se sabe que el volumen hipocampal está altamente relacionado con el comportamiento (**Bobinski y col. 1998; Su y col. 2018**). Por ende, la terapia celular probablemente restaura las funciones fisiológicas de las neuronas del hipocampo protegiendo la integridad sináptica, lo que promueve una recuperación de las conductas comportamentales.

Anteriormente se demostró que los procesos microgliales hacen conexiones íntimas pero transitorias con elementos sinápticos neuronales (**Wake y col. 2009; Ojo y col. 2012**). La activación microglial en el hipocampo observada en nuestro modelo de EAE, posiblemente prolongada en el tiempo debido a que también la observamos a los 25 días post STZ-icv (**Zappa Villar y col. 2018**), podría inducir a la liberación de citocinas proinflamatorias que contribuyen al deterioro sináptico y de las funciones cognitivas (**Streit, Mrak y Griffin 2004; Perry y O'Connor 2010; Jiang, Yu y Tan 2012**). En esta línea,

la protección ante la neuroinflamación y la pérdida sináptica inducidas por la terapia hUCPVCs se evidenció en la prevención del daño cognitivo en nuestros animales, tal como se demostró en los test de comportamiento. Asimismo, encontramos que la microglía reactiva se correlacionó negativamente, por un lado, con las proteínas sinápticas (SYT1, SYT2, SYP y GAD67), lo que sugiere la modulación de la transmisión sináptica por las células gliales, y por el otro, junto con el comportamiento de enterramiento defensivo. Este interesante vínculo entre la neuroinflamación del hipocampo y el enterramiento aberrante se explorará más a fondo en futuros estudios.

En conjunto, nuestros datos revelan que la inyección de hUCPCV-iv es una terapia prometedora para restaurar el comportamiento deteriorado, característico de la EAE. Además, los resultados respaldan el concepto de que la neuroprotección de las MSCs es ejercida por su capacidad restaurativa en la atrofia estructural y la microgliosis del hipocampo. Un hallazgo relevante es que la atenuación de la gliosis hipocampal puede desempeñar un papel importante en la recuperación del enterramiento defensivo junto con una mejora del daño sináptico. El desarrollo de terapias con MSCs para enfermedades neurodegenerativas aún se encuentra en sus primeras etapas y se requieren estudios futuros para desentrañar los mecanismos específicos de este tratamiento prometedor.

## **CAPÍTULO VI: TRANSFERENCIA GÉNICA DE IGF-1 EN MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, INDUCIDOS POR OLIGÓMEROES DEL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE (Objetivo específico 4)**

Los estudios *in vitro* en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata e *in vivo* en ratones fueron realizados en el *Laboratório de Doenças Neurodegenerativas* del Dr. Sergio T. Ferreira, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. Los análisis morfométricos en el hipocampo se llevaron a cabo en nuestro Laboratorio, INIBIOLP, FCM - UNLP.

### **6.1 Reseña introductoria**

Evidencia considerable indica que los oligómeros del péptido beta-amiloide (O $\beta$ As) se acumulan en los cerebros con EA, y estarían implicados en la disfunción sináptica temprana y el deterioro de la memoria. Previamente, el grupo brasileño informado que la exposición de neuronas hipocampales a los O $\beta$ As induce la internalización de los RI y la inhibición del IRS-1, induciendo resistencia a la insulina neuronal.

La insulina y el IGF-1 desempeñan un papel importante en la supervivencia neuronal, el aprendizaje y la memoria, y sus posibles efectos beneficiosos se han probado en ensayos clínicos para la EA. Aunque la insulina parece mejorar la cognición en individuos control y en etapas tempranas de la EA, los efectos protectores pueden no observarse en etapas tardías de la enfermedad. Posibles explicaciones para esto incluyen la eliminación del RI de la superficie neuronal instigada por oligómeros, y el bloqueo de la señalización mediada por dicho receptor debido a la inhibición de IRS-1 inducida por O $\beta$ As.

En el presente estudio, hemos investigado si el IGF-1 podría utilizarse para eludir el bloqueo de señalización del RI y promover la activación alternativa de las vías relacionadas con la insulina, protegiendo así a las neuronas del daño inducido por O $\beta$ As. Para probar nuestra hipótesis, empleamos un vector adenoviral recombinante para inducir la sobreexpresión de IGF-1 (RAd-IGF-1) antes de la exposición a los O $\beta$ As, tanto en modelos de EA *in vitro*, en cultivos de neuronas hipocampales, como *in vivo*, en ratones Swiss. Luego, evaluamos los cultivos para determinar la unión de los O $\beta$ As a las neuronas, la integridad sináptica y el estrés oxidativo neuronal. En los animales, analizamos las alteraciones de memoria y morfológicas en el hipocampo.

## 6.2 Materiales y Métodos

### 6.2.1 Preparación y caracterización de los O $\beta$ As

El péptido  $\beta$ A-(1-42) (catalogo 642-15, California Peptide Research Inc., Napa, CA) se preparó como una película seca de hexafluoro-2-propanol y se almacenó en alícuotas a -80 °C como se describió previamente (Lambert y col. 1998). La película de péptido se resuspendió con dimetilsulfóxido anhidro (DMSO; Sigma, St. Louis, MO) para obtener una solución 5 mM. Esta solución se diluyó en PBS estéril a 100  $\mu$ M (DMSO 2 %) y se conservó por 24 hs a 4 °C. De la misma manera se conservó una solución de DMSO al 2 % en PBS para ser utilizada experimentalmente como vehículo control (Veh). La preparación se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C para eliminar los agregados insolubles (protofibrillas y fibrillas), y los sobrenadantes que contenían O $\beta$ As solubles se transfirieron a tubos limpios y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización, en un período máximo de 48 hs. Para determinar la concentración de oligómeros en las preparaciones se utilizó el kit BCA (Pierce, Rockford, IL), basado en el método del ácido bicinconílico (BCA) de medida de concentración de proteínas.

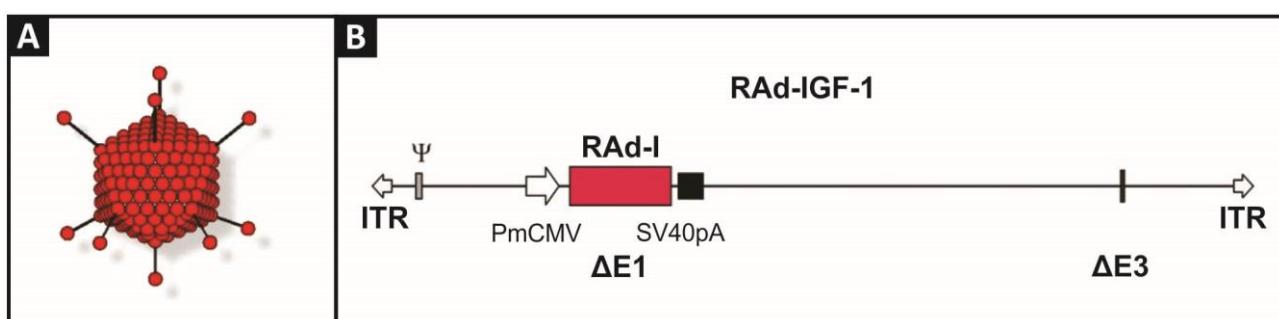
### 6.2.2 Cultivos neuronales

Los cultivos primarios de neuronas hipocampales fueron preparados a partir de embriones de rata SD con 18 días de gestación, como se ha descrito previamente (**De Felice y col. 2008**). Después de la decapitación de los embriones, los cerebros fueron removidos y transferidos a una placa de Petri conteniendo una solución estéril de PBS glucosa 2 % a 37 °C. Con la ayuda de lupa, los hipocampos fueron disecados, las meninges fueron retiradas y el tejido fue fraccionado con tijera quirúrgica estéril. Las células fueron disociadas mecánicamente con pipeta Pasteur de punta flambeada y centrifugadas a 1000 g durante 4 min a temperatura ambiente. Después de la remoción del sobrenadante, las células fueron resuspendidas en medio Neurobasal suplementado con 2 % de B27 (Gibco, Grand Island, NY), 0.5 mM de glutamina (Gibco), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) y 10  $\mu$ g/mL de fungizona (Cristália, Itapira, SP). Después de la cuantificación en cámara de Neubauer, las células fueron plaqueadas con una densidad de 1.500 células/mm<sup>2</sup> (placas de 6 y 96 pocillos, 100 y 400  $\mu$ l por pocillo respectivamente). Las placas fueron previamente tratadas con solución de poli-L-lisina a 10  $\mu$ g/ml. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, en estufa húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>, hasta el final de los experimentos a los 21 días post-plaqueo. Un tercio del volumen de medio en cada pocillo fue cambiado por medio Neurobasal suplementado fresco cada 7 días *in vitro* (DIV).

Los cultivos con 18 DIV se trataron con PBS o con el RAd que contiene la secuencia de IGF-1 (RAd-IGF-1) (**Figura 43**) (**Hereñú y col. 2007; Bellini y col. 2011**) usando una multiplicidad de infección (MOI) de 300 unidades formadoras de placa (pfu)/célula. Posteriormente, a las 21 DIV, se trataron con Veh o con O $\beta$ As (500 nM) durante 3 hs. Se evaluaron los siguientes grupos experimentales por triplicado:

- I- PBS / Veh;
- II- RAd-IGF-1 / Veh;
- III- PBS / O $\beta$ As;
- IV- RAd-IGF-1 / O $\beta$ As.

La MOI de RAd seleccionada se basó en estudios previos de caracterización del adenovector (**Hereñú y col. 2007**) y no indujo disminución de la viabilidad de los cultivos neuronales. El tiempo y dosis de O $\beta$ As elegidos en los cultivos, han mostrado inducir neurotoxicidad vinculada a la EA (**De Felice y col. 2008**).



**Figura 43: Representación esquemática del RAd-IGF-1.** Esquema de un adenovirus tipo 5 (A). Esquema del RAd contenido al gen de IGF-1 de rata (B). Abreviaturas: IGF-1, cDNA para IGF-1 de rata; ITR, repetición terminal invertida; P<sub>minCMV</sub>, promotor mínimo de citomegalovirus; SV40, señal de poliadenilación del virus simio 40; ΔE1 and ΔE3, delecciones en el genoma; Ψ, señal de empaquetamiento.

### 6.2.3 Medición de viabilidad celular

Se determinó la viabilidad de los cultivos neuronales experimentales mediante el método espectrofotométrico de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol2-ilo]-2,5- difeniltetrazol). Este método se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-

deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), por tanto, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Después del tratamiento, los cultivos neuronales fueron incubados durante 4 hs con MTT 100 µg/ml. Las células fueron disgregadas y los cristales de azul de formazán se disolvieron por la adición de 100 µl de una solución de SDS en HCl 10 mM. Luego de incubar 16 hs a 25 °C, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas. El resultado se expresó como porcentaje de MTT reducido respecto al control (células sin nada). Se realizaron tres experimentos con cultivos neuronales independientes (N = 3), cada uno con triplicado por condición experimental.

#### **6.2.4 Medición de las especies reactivas del oxígeno**

La formación de EROs se evaluó en los cultivos neuronales usando la sonda fluorescente CM-H2DCFDA (Molecular Probes) sensible a la formación de varios tipos de EROs, incluyendo peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, radicales peroxilo y peroxinitrito. El anión superóxido se detecta después de su dismutación en peróxido de hidrógeno por superóxido dismutasa neuronal. Después de 30 min de carga con la sonda fluorescente 2 µM (**De Felice y col. 2007**), las neuronas se enjuagaron tres veces con PBS y dos veces con medio neuro-basal sin rojo fenol a 37 °C. Inmediatamente, se tomaron imágenes de las células en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 300-U. Se realizaron al menos tres experimentos con cultivos neuronales independientes, cada uno con triplicado por condición experimental. Fueron adquiridas tres imágenes de campos seleccionados aleatoriamente por pozo. Los resultados obtenidos en experimentos independientes se combinaron para permitir estimaciones cuantitativas de los cambios en los niveles de EROs neuronales. El análisis cuantitativo de los datos de inmunofluorescencia se realizó con el software ImageJ (versión de Windows; National Institutes of Health) utilizando un umbral apropiado para eliminar la señal de fondo, como fue descripto por De Felice y col. (**De Felice y col. 2007**).

#### **6.2.5 Inmunocitoquímica y marcación con faloidina**

A los 21 DIV, se evaluó la unión de los oligómeros, el nivel de R-IGF-1 y de las espinas dendríticas en los cultivos primarios de hipocampo sembrados en cubreobjetos (láminas). Para la inmunocitoquímica, las células fueron fijadas 10 min con formaldehído al 4 % en PBS y bloqueadas por 2 hs en una solución con 10 % de suero normal de cabra (Gibco, Grand Island, NY) en PBS, en una cámara húmeda a temperatura ambiente, como lo describió De Felice (**De Felice y col. 2009**).

Después del bloqueo, las células fueron incubadas a 4 °C durante 12 hs en presencia del anticuerpo primario monoclonal IgG de ratón anti- $\text{O}\beta\text{As}$  NU4 (1:1000, gentilmente cedido por el Prof. William Klein, Northwestern University), o del anticuerpo primario monoclonal IgG de ratón anti-R-IGF-1 (1:500, Santa Cruz, sc-81464), durante una noche a 4 °C. Posteriormente, las neuronas se lavaron con abundante PBS y se incubaron durante 3 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG murino conjugado con Alexa Flour 488 (1:1000, Molecular Probes, Carlsbad, CA).

Para evaluar las espinas dendríticas, las neuronas se fijaron con formaldehído al 4 % en PBS y se marcaron con faloidina conjugada con Alexa Flour 488 (Alexa Fluor 488 Phalloidin, Invitrogen A12379), durante 20 min a temperatura ambiente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La faloidina se une a los haces densos de actina F localizados en las espinas dendríticas.

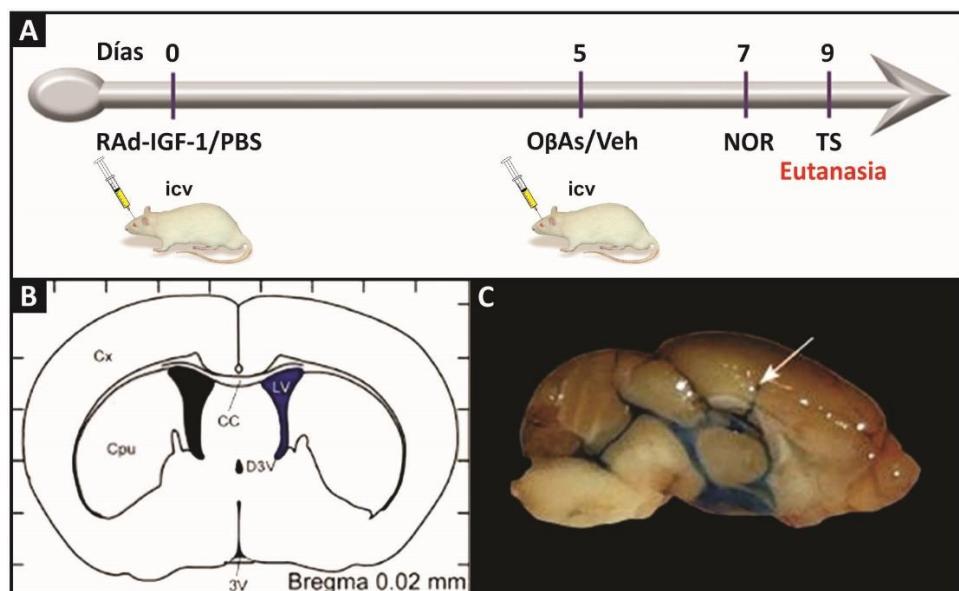
Finalmente, las células fueron visualizadas en los cubreobjetos montados con Prolong Gold y DAPI (Molecular Probes) en un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-U. La evaluación cuantitativa de las imágenes se llevó a cabo mediante el análisis de la intensidad de fluorescencia usando el software Image J (versión de Windows; National Institutes of Health). Los cuerpos celulares se eliminaron digitalmente de las imágenes de modo que solo se cuantificó la inmunotinción en los procesos dendríticos. Se empleó un umbral apropiado para eliminar la señal de fondo y se obtuvieron imágenes de treinta campos, aleatoriamente escogidos, en cada una de las 3 láminas para cada condición experimental.

#### **6.2.6 Animales e inyecciones intracerebroventriculares**

Se utilizaron ratones Swiss machos de tres meses de edad. Los animales se alojaron en grupos de cinco en cada jaula con acceso libre a comida y agua, con ciclos de 12 hs de luz/oscuridad y con temperatura y humedad ambiente controladas. Todos los procedimientos siguieron los Principios de Cuidado de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Federal de Río de Janeiro (protocolo IBQM 130/15). Los animales fueron asignados de forma aleatoria a los diferentes grupos experimentales.

Para la inyección icv de RAd-IGF-1 (o PBS) y A $\beta$ Os (o Veh), los animales se anestesiaron durante 7 min con isoflurano al 2,5 % (Cristália, São Paulo, Brasil) usando un sistema vaporizador (Norwell, MA). Una aguja de 2,5 mm de largo fue inyectada unilateralmente, 1 mm a la derecha del punto medio

equidistante a cada ojo y 1 mm posterior a una línea trazada a través de la base anterior de los ojos (Laursen y Belknap 1986; Fortuna y col. 2017). Se inyectaron 3  $\mu$ l de RAd-IGF-1 ( $5 \times 10^8$  pfu/ $\mu$ l) (Hereñú y col. 2009) (o el equivalente de PBS) en 30 s y, 5 días después, se realizó la inyección de 10 picomoles de A $\beta$ Os (o el equivalente de Veh) en un volumen final de 3  $\mu$ l (Figura 44.B-C). Los ratones que mostraron signos de hemorragia cerebral (aproximadamente el 5 % de los animales a lo largo de nuestro estudio) se excluyeron de los análisis.



**Figura 44. Inyección de tinte azul en el ventrículo cerebral lateral de ratones Swiss.** Esquema de una sección coronal de cerebro de ratón (A) [adaptado de Paxinos y Franklin, 1997]. Ventrículo lateral derecho donde se realizó la inyección icv (azul). Vista sagital (a lo largo de la línea media) de un cerebro de ratón después de la inyección de 3  $\mu$ l de tinte azul en el ventrículo (B). La flecha en B indica el sitio de inyección. Abreviaturas: Cx, corteza; CC, cuerpo calloso; Cpu, caudado putamen; LV, ventrículo lateral; 3V, tercer ventrículo; D3V, tercer ventrículo dorsal. Barra de escala 0,5 cm.

#### 6.2.7 Evaluación de la memoria de reconocimiento

El test NOR se realizó en un campo abierto de  $30 \times 30 \times 45$  cm, cuyo piso estaba dividido por líneas en nueve rectángulos iguales. Se utilizaron objetos de plástico de diferentes formas y texturas. Las pruebas preliminares mostraron que ninguno de los objetos utilizados en nuestros experimentos evocó una preferencia innata. Todas las etapas del test fueron filmadas con una cámara digital suspendida en el techo del cuarto de comportamiento.

Dos horas antes del entrenamiento, cada animal se sometió a una sesión de habituación de 5 min de duración, en la que se les permitió explorar libremente la arena vacía. El entrenamiento consistió en una sesión de 5 min de duración durante la cual los animales se colocaron en el centro de la arena en presencia de dos objetos idénticos. Dos horas después del entrenamiento, los animales fueron nuevamente colocados en la arena durante 5 min para la sesión de reconocimiento, en la cual uno de los dos objetos utilizados en la sesión de entrenamiento fue reemplazado por uno nuevo. La arena y los objetos se limpiaron minuciosamente entre ensayos con etanol al 10 % para eliminar las señales olfativas.

Olfatear y tocar el objeto se consideró como comportamientos exploratorios. Se midió el tiempo que dedicó el animal a explorar los objetos familiares y el novedoso. Los resultados se expresaron como porcentaje de tiempo explorando cada objeto durante la sesión de reconocimiento y se analizaron mediante t-Test de Student, comparando el tiempo medio de exploración para cada objeto con el valor fijo del 50 % (que corresponde al porcentaje por azar). Por definición, los animales que reconocen el objeto familiar como tal (es decir, aprenden la tarea) exploran el objeto nuevo > 50 % del tiempo total.

#### **6.2.8 Evaluación del comportamiento depresivo**

El método se basa en la observación de ratones suspendidos por la cola, los cuales alternan su comportamiento entre períodos de agitación e inmovilidad. El comportamiento esperado es una baja inmovilidad como indicio de lucha o huida, por lo que tiempos menores de inmovilidad demuestran un comportamiento menos depresivo.

Los ratones fueron colgados durante 6 min utilizando una cinta adhesiva colocada a 20 mm del extremo de su cola. Para cada animal, se cuantificó el tiempo de inmovilidad y el resultado se expresó como porcentaje de tiempo inmóvil en los 6 min de prueba.

#### **6.2.9 Diseño experimental**

Los animales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos de 10 animales cada uno: I- **PBS / Veh**; II- **RAd-IGF-1 / Veh**; III- **PBS / O $\beta$ As**; IV- **RAd-IGF-1 / O $\beta$ As**. En el DEx 0, los ratones fueron tratados con una inyección icv unilateral de PBS (grupos I y III) o de RAd-IGF-1 (grupos II y IV). Cinco días después (DEx 5), mediante una segunda inyección icv idéntica y en el mismo sitio, los animales recibieron Veh (grupos I y II) o A $\beta$ Os (grupos III y IV). En el DEx 6 los ratones se sometieron al protocolo

del test NOR y al día siguiente, DEx 7, se realizó el test de suspensión por la cola (6 min) y, finalmente, la eutanasia de todos los animales (**Figura 44.A**).

### **6.2.10 Procesamiento de los cerebros**

El DEx 7 los animales destinados a estudios bioquímicos fueron decapitados, se les extrajo el cerebro y se disecaron los hipocampos bilaterales para ser inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Por otra parte, los animales destinados a IHQ fueron anestesiados con sevofluorano y se realizó una perfusión intracardiaca a una velocidad de 3 ml/min con una bomba peristáltica (Gilson modelo minipuls 2 MP312), primero con 50 ml de solución fisiológica heparinizada (0,86 UI/ml), seguido de 100 ml de PFA al 4% en buffer fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4, preparado inmediatamente antes de la perfusión. Los cerebros se extirparon, se fijaron en PFA al 4 % a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se cortaron en 6 series de secciones coronales de 40 µm de espesor con un vibrátomo (VT1000S, Leica Microsystems), es decir, en cada cerebro, una serie contiene una de cada seis secciones para obtener un conjunto de secciones seriadas no contiguas que abarcaban el hipocampo dorsal. Las secciones se mantuvieron en solución criopreservadora (ver **sección 3.2.7**) a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **6.2.11 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Para cada animal, se procesaron 3 series de secciones para evaluar microglía, astroglía y neuroblastos. La IHQ para Iba1 y GFAP se realizó según se describió en la **sección 4.2.7**. Se evaluó el número de los neuroblastos como indicador de neurogénesis mediante inmunofluorescencia. Las secciones se incubaron durante una noche a 4 °C con el anticuerpo primario polyclonal anti-DCX, hecho en cabra (dilución 1:250; c-18, Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas) y 2 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario polyclonal hecho en burro anti-cabra Alexa 594 (Jackson ImmunoResearch, 705-585-003). Finalmente, se deshidrataron las secciones y se montaron con Fluoromount-G (Invitrogen, 00-4958-02).

### **6.2.12 Obtención de imágenes**

Para obtener las imágenes de las IHQ utilizamos un microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara de video Olympus DP70 CCD (Tokio, Japón). Dentro del hipocampo, centramos nuestro análisis en neuronas inmaduras del GD y células microgliales y astrogliales del SR, como se describió previamente en la **sección 4.2.8**.

### **6.2.13 Volumen del Stratum Radiatum y del Dentate Hilus**

El volumen del SR y del DH fue estimado empleando el método de Cavalieri. Se procedió como se describió previamente para el caso del SR (ver **sección 4.2.9**). Para cuantificar el área del DH de cada sección, la muestra se delimitó estableciendo como límite a la capa celular (GCL) del GD, cuya extensión varía en función de la morfología de la región (**Paxinos G y Watson C 1998**).

### **6.2.14 Análisis de neuroblastos y células gliales hipocampales**

Los análisis de IHQ de DCX, Iba-1 y GFAP se realizaron, según se detalló en **las secciones 3.2.10 y 4.2.11 - 4.2.12**.

### **6.2.15 Análisis de Western Blot para IGF-1**

Con el fin de evaluar si 7 días después de la administración icv del RAd-IGF-1 aumentan los niveles de IGF-1 en el hipocampo de los animales. Los niveles extracelulares de IGF-1 en el hipocampo se determinaron por WB. Brevemente, los hipocampos fueron homogeneizados en buffer RIPA conteniendo inhibidores de proteasa y fosfatasa como se describió previamente en la **sección 3.2.12**. Luego, muestras que contenían 30 µg de proteína se resolvieron en geles de poliacrilamida al 15 % (Invitrogen) con buffer Tris-glicina-SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL) a 350 mA durante 1 h. Las membranas se bloquearon con BSA al 5% en TBS-T a temperatura ambiente durante 2 hs y luego se incubaron a 4 °C durante toda la noche con anticuerpo primario polyclonal de conejo anti-IGF-1 (1:500, Santa Cruz, sc-9013) diluido en buffer de bloqueo. Las membranas se incubaron luego con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con IRDye 800CW (1:10.000) a temperatura ambiente durante 2 hs. Se obtuvieron imágenes usando el sistema de formación de imágenes Odyssey® y se analizaron usando el software NIH Image J.

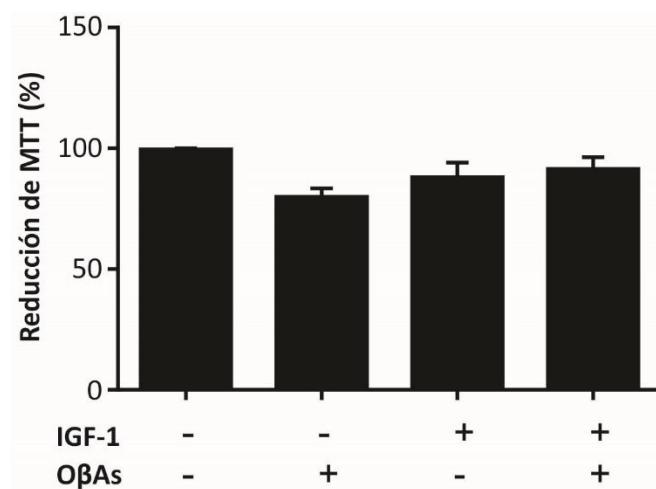
### **6.2.16 Análisis estadístico**

Todos los estudios *in vitro* junto con el test de suspensión por la cola, el WB y análisis morfométricos en el hipocampo se analizaron mediante ANOVA de una vía. En el test NOR, las comparaciones del tiempo total de exploración de los objetos familiares y novedosos durante las sesiones de entrenamiento y reconocimiento se examinaron mediante t-Test contra un valor fijo. Se usaron pruebas post-hoc cuando fue apropiado. Todos los datos se representaron como media ± SEM y se estimaron utilizando el software *Graph Prism*. P < 0,05 fue establecido como significativo.

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Viabilidad de los cultivos neuronales transducidos con el vector adenoviral y expuestos a O $\beta$ As

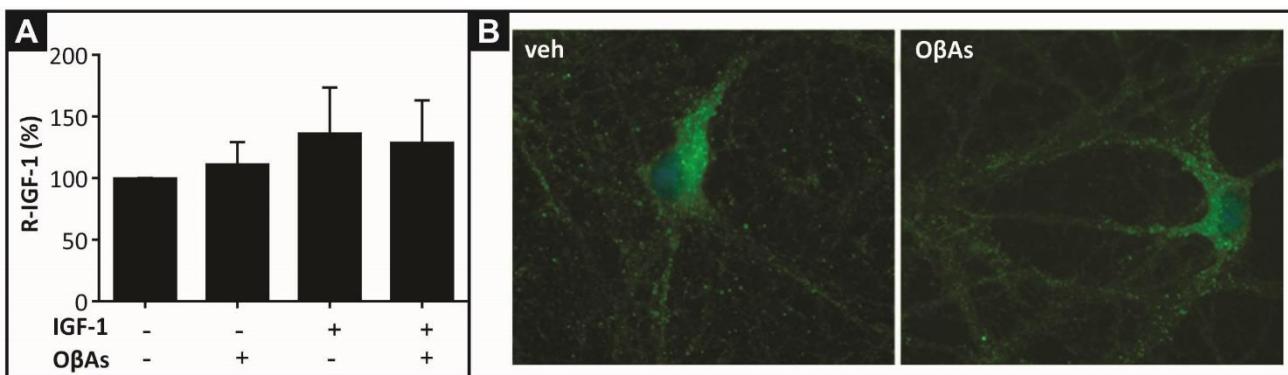
Iniciamos nuestros análisis investigando si las neuronas hipocampales serían afectadas por la exposición a la MOI seleccionada de nuestro vector adenoviral y por la concentración de O $\beta$ As elegida. Los resultados de evaluar la viabilidad de los cultivos primarios expuestos a las diferentes condiciones experimentales indican que la exposición al RAd-IGF-1 (MOI de 300 pfu/célula) durante 3 días y/o a los O $\beta$ As (500 nM) por 3 hs no altera la viabilidad de los cultivos neuronales (**Figura 45**).



**Figura 45: Viabilidad de los cultivos neuronales por el ensayo de MTT.** Se determinó la viabilidad de las neuronas hipocampales incubadas con RAd-IGF-1 (MOI de 300 pfu/célula) durante 3 días y/o O $\beta$ As (500 nM) por 3 hs respecto al control. N = 3

### 6.3.2 Niveles del receptor de IGF-1 no alterados en la superficie neuronal por exposición a O $\beta$ As *in vitro*

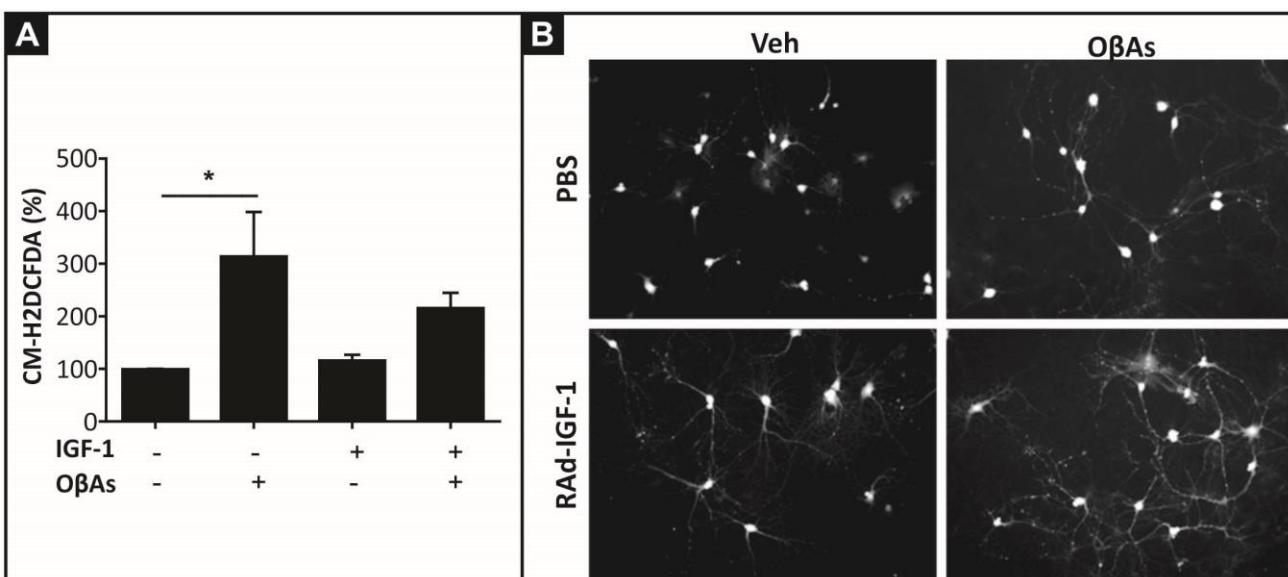
Para esclarecer si los O $\beta$ As inducen la internalización del R-IGF-1 y, consecuentemente, bloquean su activación por el IGF-1 circulante, evaluamos los niveles de dicho receptor en la membrana plasmática. Nuestros resultados demuestran que la exposición de cultivos de neuronas hipocampales a O $\beta$ As (500 nM) durante 3 hs no indujo ningún cambio en los niveles del R-IGF-1 en la superficie de la célula (**Figura 46**). Esto sugiere que la vía de activación del R-IGF-1 puede ser un potencial objetivo para compensar los daños ocasionados por el tratamiento con O $\beta$ As.



**Figura 46.** Niveles de receptor de IGF-1 en la superficie neuronal cuantificados en % de intensidad de fluorescencia en cultivos primarios de neuronas hipocampales para las distintas condiciones experimentales respecto al control. Objetivo 400X. N = 3.

### 6.3.3 Prevención del aumento de especies reactivas del oxígeno inducido por los OβAs *in vitro*

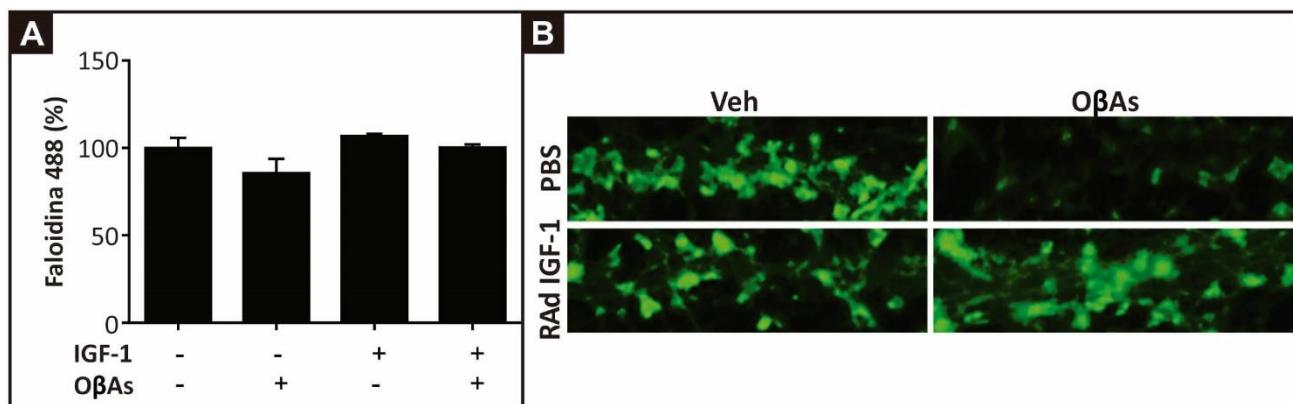
Para evaluar el estrés oxidativo en nuestro modelo experimental *in vitro*, los cultivos de neuronas hipocampales de 18 DIV fueron transfectados con el vector RAd-IGF-1 para inducir la sobreexpresión de IGF-1 y, a los 21 DIV, se los expuso a OβAs (500 nM) durante 3 hs. Confirmamos que la concentración de OβAs evaluada causa un aumento en los niveles de EROS en comparación con los cultivos controles, mientras que las neuronas transfectadas con RAd-IGF-1 no difieren del control, sugiriendo que el pretratamiento con IGF-1 protege a las neuronas contra el aumento de EROS inducido por los OβAs (Figura 47).



**Figura 47.** Niveles de especies reactivas del oxígeno en neuronas hipocampales. Cuantificación del porcentaje de intensidad de fluorescencia CM-H2DCFDA en las distintas condiciones experimentales respecto al control (A). Imágenes (100 X) representativas de cada grupo (B). N = 3. \* P ≤ 0,05.

### 6.3.4 Protección parcial de la pérdida de espinas dendríticas inducida por los O $\beta$ As *in vitro*

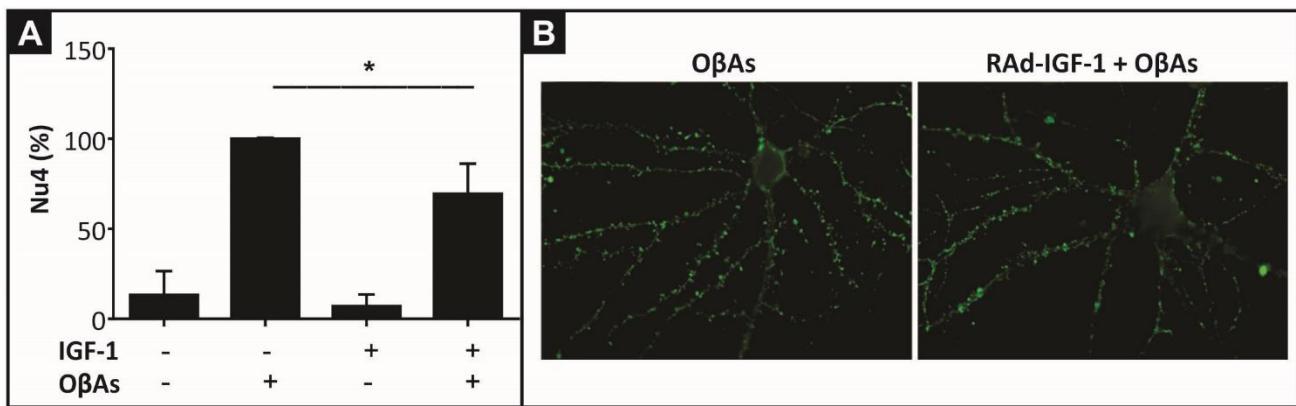
En el presente estudio, evaluamos si el IGF-1 es capaz de proteger a las neuronas hipocampales de la disminución en el número de espinas dendríticas inducida por los O $\beta$ As mediante el tratamiento previo de las neuronas con RAd-IGF-1. Para esto, los cultivos neuronales con 21 DIV, previamente transducidos con el vector RAd-IGF-1 (18 DIV), fueron tratados durante 3 hs con O $\beta$ As 500nM y se cuantificó la cantidad de espinas dendríticas por inmunocitoquímica. En primer lugar, las neuronas tratadas con RAd-IGF-1 que no fueron expuestas a los O $\beta$ As mostraron un leve incremento en el número de espinas dendríticas en comparación con las neuronas control expuestas al Veh. Además, de manera interesante, observamos que la sobreexpresión de IGF-1 atenuó la pérdida de espinas dendríticas inducida por los O $\beta$ As en los cultivos neuronales, aunque la modificación no alcanzó a ser estadísticamente significativa (**Figura 48**).



**Figura 48. Espinas dendríticas de neuronas hipocampales.** Cuantificación del porcentaje de intensidad de fluorescencia utilizando faloidina 488 en las distintas condiciones experimentales respecto al control (A). Imágenes (1000 X) representativas de segmentos dendríticos de cada grupo (B). N = 3.

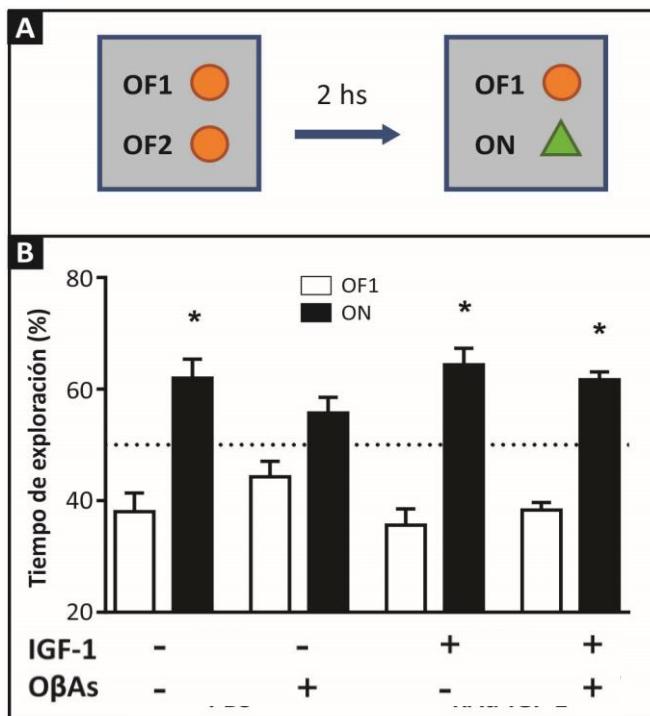
### 6.3.5 Reducción de la unión de O $\beta$ As a las neuronas *in vitro*

Con el objetivo de establecer si el efecto neuroprotector de IGF-1 está mediado por el bloqueo de la unión de O $\beta$ As a las neuronas, los cultivos de neuronas hipocampales con 21 DIV, previamente transducidos con el vector RAd-IGF-1 (18 DIV), fueron tratados durante 3 hs con O $\beta$ As 500 nM y se cuantificaron los niveles de O $\beta$ As unido a las células por inmunocitoquímica. Observamos que el tratamiento con IGF-1 disminuyó significativamente la unión de los O $\beta$ As a las neuronas (**Figura 49**), lo que sugiere que el IGF-1 puede proteger a las neuronas de los efectos nocivos inducidos por los O $\beta$ As de una manera dependiente a la reducción en su unión.



### 6.3.6 Protección *in vivo* de la pérdida de memoria en ratones expuestos a O $\beta$ As

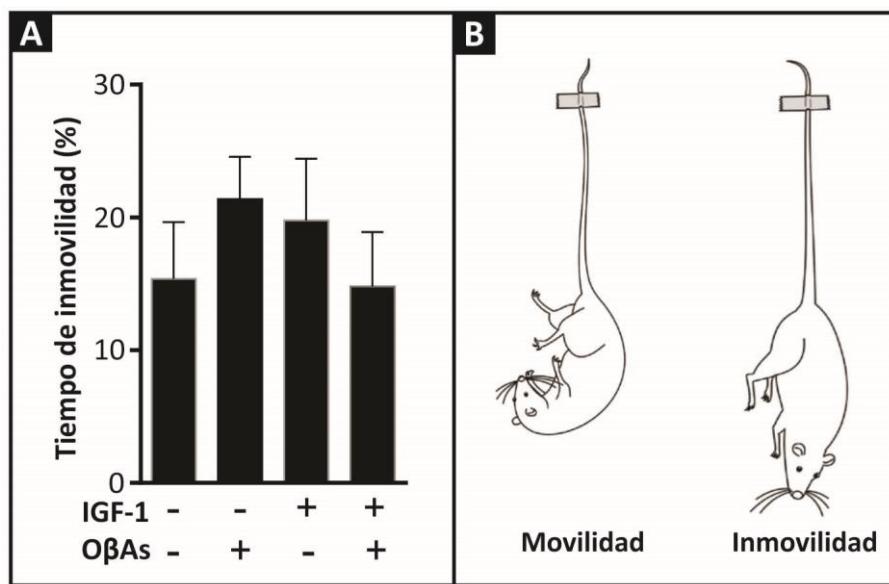
Para comprobar los efectos del IGF-1 sobre el desempeño cognitivo, evaluamos los animales expuestos a O $\beta$ As mediante el test NOR. Inyectamos el vector RAd-IGF-1 icv en ratones Swiss y, 5 días después, utilizamos la misma ruta para inyectar 10 pmol de O $\beta$ As. Los O $\beta$ As-icv causaron una alteración cognitiva que se previno con el tratamiento con RAd-IGF-1, demostrando que la sobreexpresión de IGF-1 puede proteger a los ratones de la pérdida de memoria de reconocimiento inducida por los O $\beta$ As (Figura 50).



**Figura 50. Test de reconocimiento del objeto nuevo.** Esquema del diseño del test NOR (A); se realizó la sesión de entrenamiento con dos objetos idénticos y, 2 hs después, se evaluó la sesión de reconocimiento con un objeto nuevo. Porcentaje de exploración de los objetos familiar (OF1) y nuevo (ON) en la sesión de reconocimiento en los ratones Swiss para las distintas condiciones experimentales respecto al control (B). La estadística de columnas compara el % de tiempo de exploración del objeto nuevo con el valor hipotético de 50 %. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. N = 9. \* P  $\leq$  0,05.

### 6.3.7 Evaluación del comportamiento depresivo en ratones expuestos a OβAs

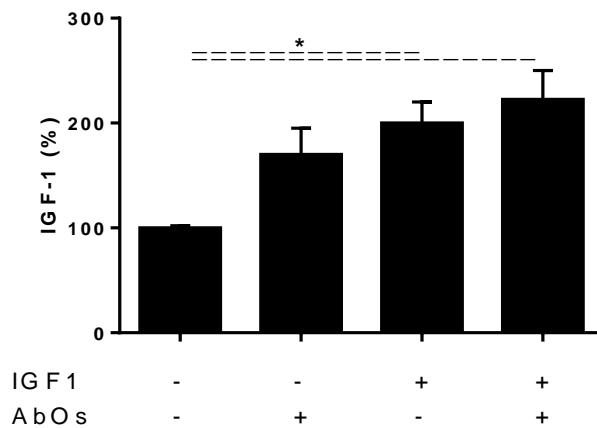
Un día después del test NOR, los animales expuestos a OβAs fueron evaluados mediante el test de suspensión por la cola para comprobar los efectos del IGF-1 sobre el comportamiento depresivo. Si bien se ve una tendencia hacia un mayor comportamiento depresivo en los animales tratados con oligómeros, este no llegó a ser significativo. Más aún, no observamos diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales (Figura 51).



**Figura 51. Test de suspensión por la cola.** No se observaron diferencias en el porcentaje de tiempo de inmovilidad en los ratones Swiss para las distintas condiciones experimentales respecto al control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. N = 9.

#### 6.3.8 Aumento *in vivo* de los niveles de IGF-1 en el hipocampo

Al final del experimento evaluamos los niveles de IGF-1 en el hipocampo de los animales. Confirmamos que el RAd-IGF-1 indujo un aumento de aproximadamente 200 % en los niveles extracelulares de IGF-1 en el hipocampo, 9 días después de la administración del vector (Figura 52).

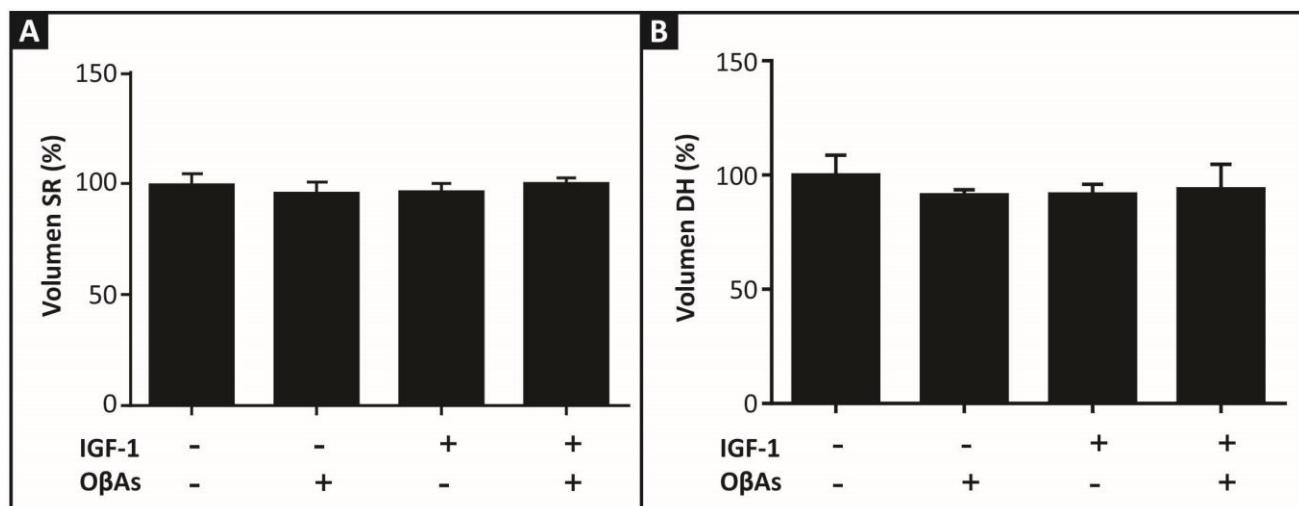


**Figura 52. Niveles de IGF-1 en el hipocampo de ratones Swiss.** Cuantificación por Western Blot expresado como porcentaje para las distintas condiciones experimentales respecto al control. N = 4. \* P  $\leq$  0,05.

### 6.3.9 Cambios morfológicos en el hipocampo de los ratones expuestos a O $\beta$ As

#### 6.3.9.1 Análisis del volumen hipocampal

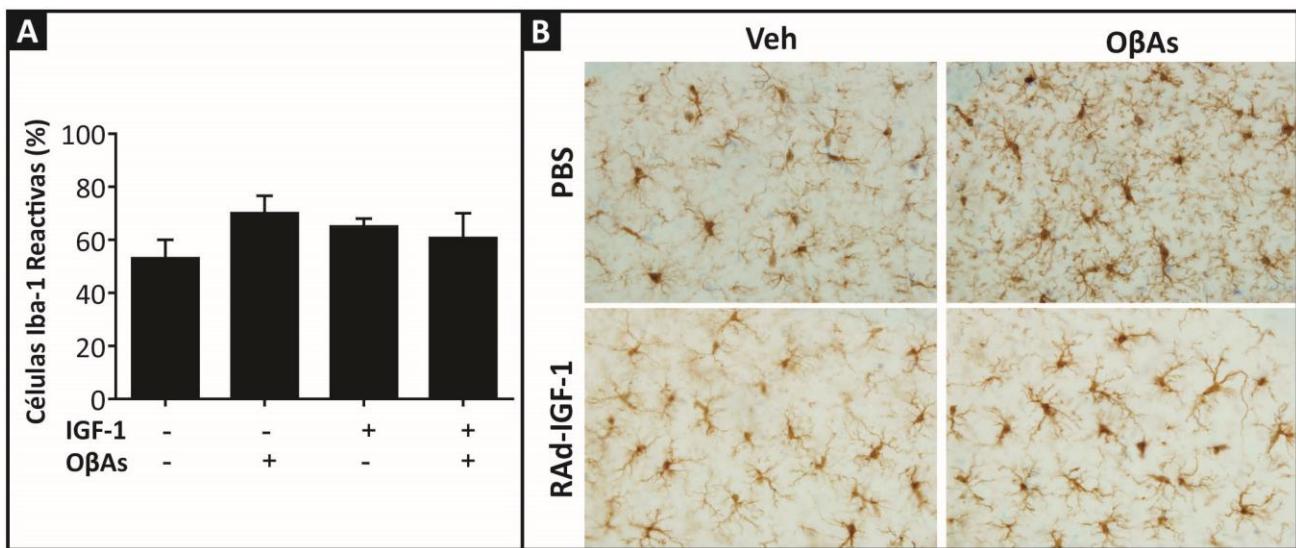
Se evaluó el volumen del SR y del DH para buscar signos de atrofia hipocampal. No se observó variación del volumen de las regiones analizadas en ningún grupo experimental (**Figura 53**).



**Figura 53. Volumen del *Stratum Radiatum* (SR) y del *Dentate Hilus* (DH).** No se observaron diferencias en los porcentajes de los volúmenes para las condiciones experimentales evaluadas respecto al control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. N = 5.

#### 6.3.9.2 Análisis de células microgliales

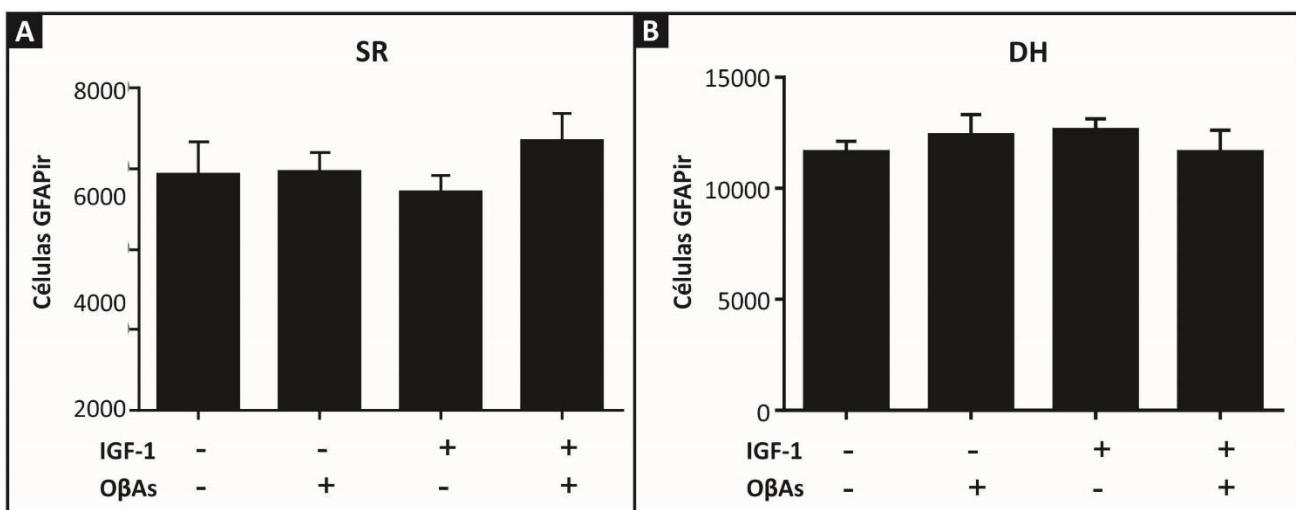
Las células microgliales Iba1ir se contaron y clasificaron como reactivas y no reactivas en el SR hipocampal. No hubo diferencias significativas en el número de células Iba1ir reactivas (**Figura 54**), no reactivas, ni totales (datos no mostrados) entre los grupos experimentales evaluados. Sin embargo, se observó una tendencia a aumentar el porcentaje de células reactivas en el grupo con oligómeros (32 %) respecto del grupo control.



**Figura 54. Células microgliales Iba-1 inmunorreactivas (Iba-1ir) en el *Stratum Radiatum* (SR) hipocampal.** No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células Iba-1 reactivas (A). Imágenes de las células Iba-1ir (600X) en animales representativos de cada grupo experimental (B). Los datos fueron representados como media  $\pm$  SEM. N = 5.

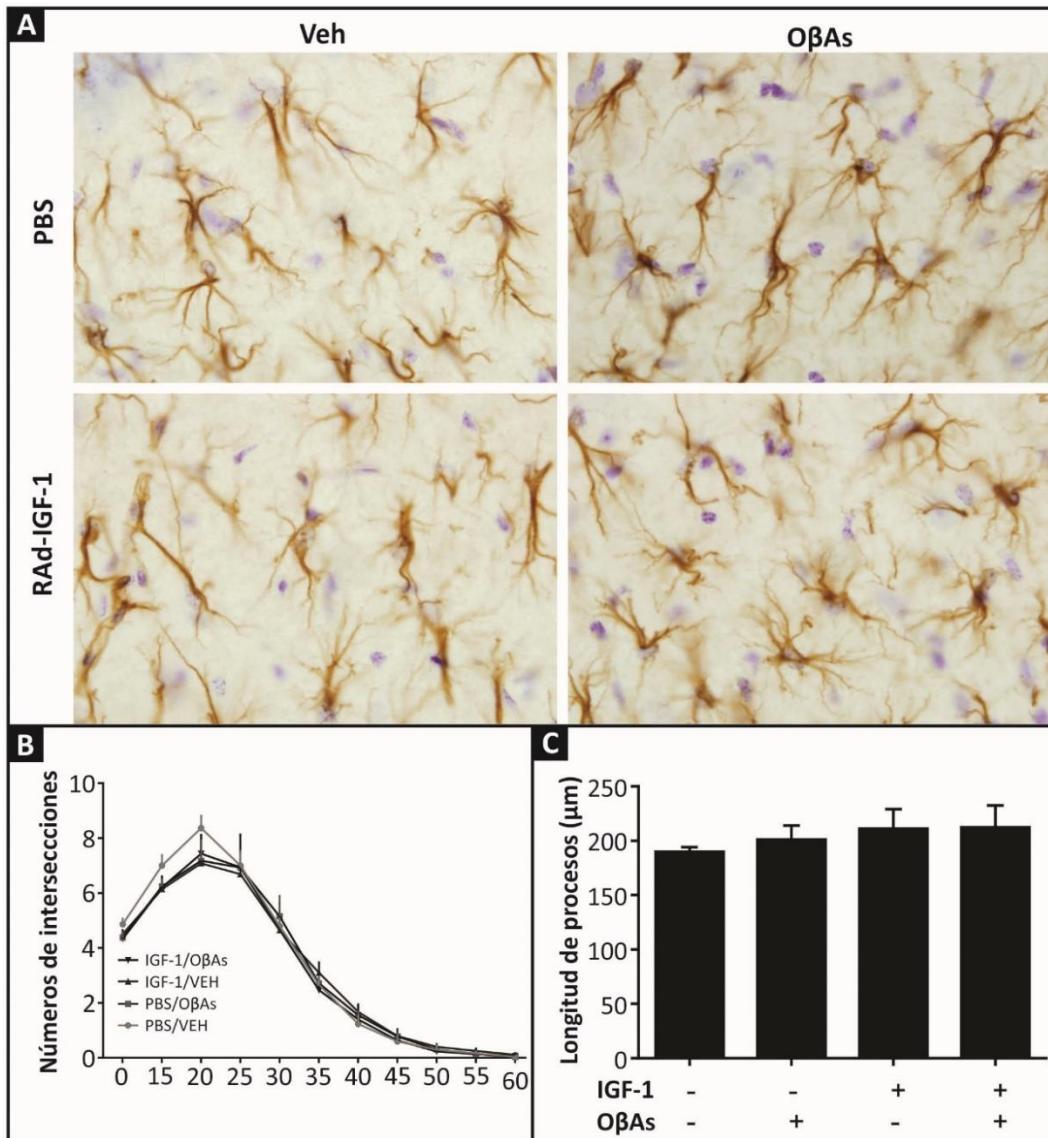
### 6.3.9.3 Análisis de células astrogliales

El número de células GFAPir (astroglía) se evaluó en SR y DH hipocampales (Figura 55). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales para este recuento en ambas zonas.



**Figura 55. Astrocitos GFAP inmunorreactivos (GFAPir) en el hipocampo dorsal.** No se observaron cambios en el número de astrocitos GFAPir de los ratones Swiss en el *Stratum radiatum* (SR) (A) ni en el *Dentate Hilus* (DH) (B). N = 5. Los datos fueron representados como media  $\pm$  SEM.

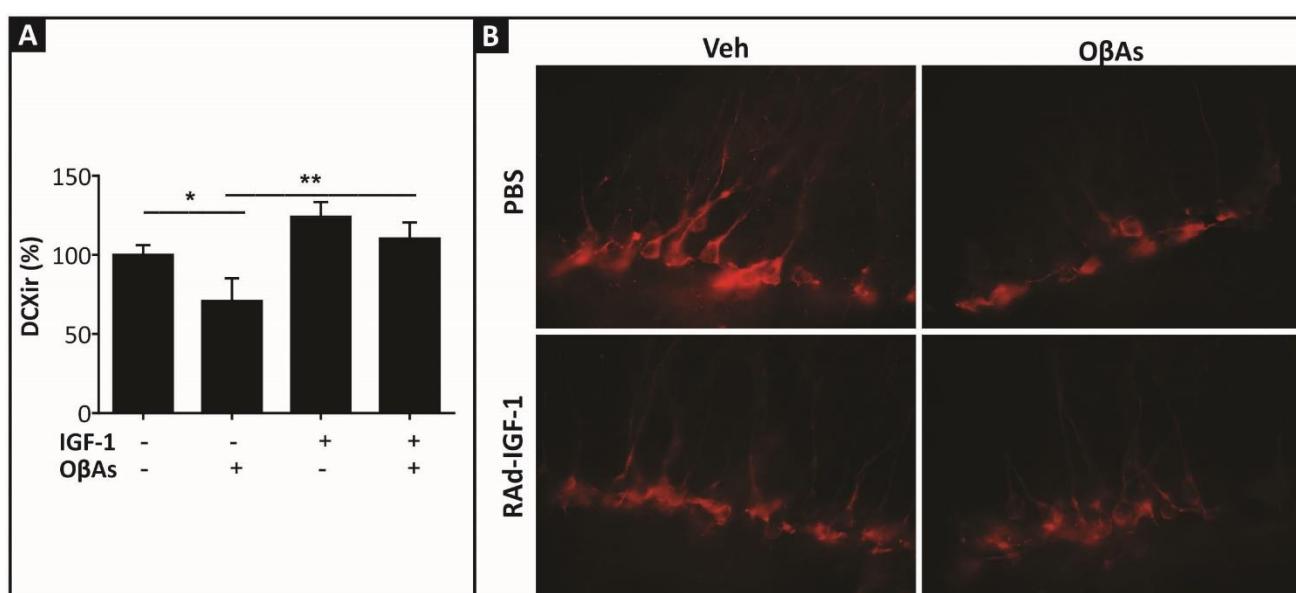
Así mismo, el análisis de Sholl en el SR no reveló diferencias en la complejidad de las ramificaciones de los astrocitos ni tampoco en la longitud media de los procesos astrocitarios GFAPir (**Figura 56**).



**Figura 56. Análisis de Sholl de astrocitos GFAP inmunorreactivos (GFAPir) en el *Stratum Radiatum* (SR) hipocampal.** Imágenes de las células GFAPir (1000 X) en animales representativos de cada grupo experimental (A). Complejidad de las ramificaciones calculada como el número de intersecciones  $i$  de los procesos por anillo (B). Longitud promedio de los procesos astrocitarios estimada como la suma de los valores de  $i$  para cada anillo multiplicado por 5 (C). No se observaron diferencias significativas. N = 25 astrocitos para cada rata. N = 5 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM.

#### 6.3.9.4 Análisis de neuronas inmaduras

Finalmente, evaluamos si el IGF-1 es capaz de proteger a los animales de la disminución en la neurogénesis inducida por los O $\beta$ As mediante el tratamiento previo con RAd-IGF-1. En primer lugar, los ratones con O $\beta$ As mostraron una disminución significativa en el número de células DCXir. Los animales tratados con RAd-IGF-1 (no expuestos a los O $\beta$ As) mostraron un incremento, que no alcanza a ser significativo, en el número de neuronas inmaduras en comparación con los controles (con vehículo). Además, de manera interesante, observamos que la sobreexpresión de IGF-1 previno de manera significativa la pérdida de la neurogénesis inducida por los O $\beta$ As en los animales (Figura 57).



**Figura 57. Neuronas DCX inmunorreactivas (DCXir) en el giro dentado (GD) hipocampal.** Se observó una disminución significativa en el porcentaje de células DCXir para los animales tratados con O $\beta$ As y un notable incremento luego de la sobreexpresión de IGF-1 (A). Neuroblastos DCXir en el GD de animales representativos de cada grupo (1000 X) (B). N = 5 por grupo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones se hicieron versus el grupo control. \*P  $\leq$  0,05; \*\*P  $\leq$  0,01.

#### 6.4 Discusión

Los O $\beta$ As son toxinas solubles que se acumulan en el cerebro con EA e inducen fallo y pérdida de las sinapsis y, eventualmente, déficit de memoria (Lacor y col. 2007; Shankar y col. 2008, 200; Koffie y col. 2009; Wilcox y col. 2011; Sivanesan, Tan y Rajadas 2013; Selkoe y Hardy 2016; Lesné y col. 2006). En el presente estudio, evaluamos si la sobreexpresión de IGF-1 podría utilizarse para proteger a las neuronas del daño inducido por la exposición exógena a O $\beta$ As *in vitro* e *in vivo*.

Previamente fue demostrado que la muerte neuronal inducida por los O $\beta$ As es dosis y tiempo dependiente (**Louzada y col. 2004; Alberdi y col. 2010**). Las neuronas hipocampales maduras presentan una reducción significativa de la viabilidad (evidenciada por el ensayo de MTT) a partir de 48 hs de exposición a los oligómeros a una concentración final de 500 nM, la misma que fue utilizada en el presente estudio, mostrando una toxicidad creciente después de tiempos más largos de exposición (**Saraiva y col. 2010**). Coincidentemente, nuestros resultados no evidenciaron pérdida de viabilidad en los cultivos neuronales con 24 hs de exposición a dicha concentración de O $\beta$ As.

Dado que los efectos de los O $\beta$ As se han relacionado con un deterioro en la señalización de la insulina que puede conducir a pérdida sináptica y neurodegeneración en la EA, la reactivación de la vía insulínica alterada aparece como un objetivo terapéutico de interés. Sin embargo, cabe mencionar que los O $\beta$ As inducen la internalización del RI de la membrana plasmática y, consecuentemente, bloquean su activación, lo que contribuye a la resistencia a insulina e impide el éxito de un tratamiento basado en insulina (**De Felice y col. 2009**). Por ello resultaba interesante evaluar si se puede sortear dicha limitación utilizando otra molécula capaz de activar la vía de la insulina, como es el caso del IGF-1. En contraste con el efecto de los O $\beta$ As sobre el RI, observamos que la exposición de cultivos de neuronas hipocampales a O $\beta$ As (500 nM) durante 3 hs no indujo ningún cambio en los niveles del R-IGF-1 en la superficie de la célula. Esto sugiere que la activación del R-IGF-1 puede ser un potencial blanco terapéutico para reactivar la señalización de insulina alterada por el tratamiento con O $\beta$ As y contribuir a atenuar la neurodegeneración que éstos inducen.

El estrés oxidativo es un evento crítico para el desencadenamiento del proceso degenerativo que culmina en la pérdida de memoria característica de la EA, particularmente mediado por la generación excesiva y continua de EROs intracelulares, disfunción mitocondrial y / o disminución de la actividad de enzimas involucradas en la defensa antioxidante (**Walsh y Selkoe 2004; Ferreira y Klein 2011**). En estudios *in vitro* se ha documentado que el IGF-I protegió a los astrocitos del estrés oxidativo generado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Genis y col. 2014**). Planteamos entonces que el estrés oxidativo provocado por los O $\beta$ As *in vitro* (**De Felice y col. 2007**) podría ser atenuado por la sobreexpresión del IGF-1. Efectivamente, nuestros resultados confirman el efecto neuroprotector del pretratamiento con IGF-1 contra el incremento de EROs inducido por los O $\beta$ As en neuronas hipocampales.

Por otra parte, las espinas dendríticas son estructuras postsinápticas necesarias para la plasticidad neuronal y la formación de la memoria. Previamente, se ha demostrado que los O $\beta$ As 500 nM

reducen el número de espinas dendríticas *in vitro* después de 24 hs de exposición (**De Felice y col. 2009**). En el presente estudio, observamos que la sobreexpresión de IGF-1 redujo levemente la pérdida de espinas dendríticas inducida por los O $\beta$ As en los cultivos neuronales. En línea con nuestros resultados, un estudio en ratones mutantes, que presentan disminución de espinas sinápticas y de la expresión de la proteína post-sináptica 95 (PSD-95), demostró que el IGF-1 exógeno incrementa la densidad de espinas dendríticas y la expresión de la PSD-95 (**Della Sala y col. 2016, 20**). En estudios previos de nuestro laboratorio, en el modelo de rata senil, la terapia con IGF-1 indujo la sobreexpresión de genes relacionados con la plasticidad sináptica en el hipocampo (**Pardo y col. 2017**). En conjunto, estos resultados y los nuestros le otorgan al IGF-1 un papel protector de la sinapsis.

Estudios con neuronas tratadas con los O $\beta$ As mostraron que el tratamiento con insulina protege a las neuronas de la toxicidad de los O $\beta$ As por disminución de la unión de éstos a las neuronas (**De Felice y col. 2009**). Teniendo en cuenta este trabajo, nos propusimos intentar esclarecer si el efecto neuroprotector de IGF-1 está mediado por el bloqueo de la unión de los oligómeros a las neuronas o por la reactivación de la vía de supervivencia de la insulina. Dado que el tratamiento con IGF-1 generó una disminución significativa de la adhesión, nuestros resultados sugieren que el efecto neuroprotector del IGF-1 sobre las neuronas incubadas con O $\beta$ As es dependiente de la reducción de su unión. Por lo tanto, la acción preventiva del IGF-1 en la formación de EROs y en la pérdida de espinas sinápticas aquí reportada probablemente deriva en primera instancia de su capacidad para bloquear la unión de los oligómeros a las neuronas.

Sobre la base de nuestros hallazgos respecto a la neuroprotección del IGF-1 *in vitro* y estudios en los cuales se hipotetizó que la sobreexpresión de IGF-1 en el cerebro podría prevenir el deterioro de la memoria desencadenado por los O $\beta$ As (**Bomfim y col. 2012**) fue que realizamos un primer abordaje terapéutico con IGF-1 en ratones del modelo de AE por la administración icv O $\beta$ As.

En primer lugar, confirmamos que nuestro vector adenoviral aumentaba los niveles de IGF-1 en el hipocampo cuando se inyectaba icv en el modelo de EA inducido por O $\beta$ As-icv. De manera similar, en un estudio previo de nuestro laboratorio, se analizó la sobreexpresión de IGF-1 en LCR de ratas luego de la terapia génica con RAd-IGF-1 en los VL (**Hereñú y col. 2009**). Luego, evaluamos los efectos de ambos tratamientos en la memoria de los ratones mediante el test NOR. Como se ha informado previamente (**Fortuna y col. 2017**) la concentración de oligómeros utilizada originó déficit cognitivo,

el cual fue evitado con el pretratamiento con nuestro RAd-IGF-1. Este resultado soporta la idea que la sobreexpresión de IGF-1 puede proteger contra la pérdida de memoria de reconocimiento en modelos animales de EA.

Sin embargo, a diferencia de lo observado en la EA (**Bademli, Lök y Selçuk-Tosun 2018, 201**) y en otros modelos animales de EA (**Weinstock y Shoham 2004**), los O $\beta$ As-icv parecen no afectar los mecanismos cerebrales involucrados en el comportamiento depresivo de los animales, al menos a la dosis utilizada.

Por otra parte, otro estudio ha demostrado que los oligómeros inducen una señalización proinflamatoria que conlleva al fallo sináptico y pérdida de memoria característicos de la EA (**Lourenco y col. 2013**). No obstante, nuestros resultados no evidenciaron atrofia hipocampal ni alteraciones significativas en las poblaciones de microglía y astroglía tras el tratamiento con oligómeros. Esto sugiere que los O $\beta$ As-icv no actuarían primariamente sobre la glía hipocampal. Con el fin de ampliar estos estudios nuevas investigaciones respecto al perfil inflamatorio inducido por los oligómeros están siendo realizadas por nuestro grupo de trabajo.

Tanto el envejecimiento y como la EA afectan notablemente al nicho de neurogénesis en el GD adulto (**Pardo y col. 2016**). En este sentido, la inyección de O $\beta$ As-icv produjo una disminución evidente en la neurogénesis hipocampal, la cual probablemente, contribuye a generar los déficits cognitivos observados en el modelo *in vivo* de EA. Cabe destacar que nuestro grupo describió previamente que la disminución de DCX relacionada con la edad en el GD podía revertirse por la sobreexpresión cerebral de IGF-1 en ratas seniles (**Pardo y col. 2018, 20**). En esta línea, comprobamos la hipótesis de que la terapia génica con IGF-1 tiene un efecto restaurador en la tasa de neurogénesis afectada por los oligómeros en los ratones.

En síntesis, la sobreexpresión de IGF-1 en el cerebro constituye una estrategia eficaz para prevenir el daño neuronal en la EA experimental. El efecto neuroprotector del IGF-1 sobre las neuronas probablemente es el resultado de la combinación de sucesos: una disminución de la unión de oligómeros a neuronas, la mantención de la integridad sináptica y una mejora de las vías de señalización relacionadas con la insulina. Más estudios *in vivo* son necesarios para evaluar estos procesos y para intentar dilucidar el mecanismo mediante el cual actúa el IGF-1 en la EA experimental.

## CAPÍTULO VII: CONSTRUCCIÓN DE UN NUEVO SISTEMA DE ADENOVECTORES PARA IMPLEMENTAR TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA EN TRASTORNOS INFLAMATORIOS (Objetivo específico 5)

### 7.1 Reseña introductoria

La timulina es un péptido de origen tímico que posee efectos antiinflamatorios. Durante años, nuestro grupo ha trabajado con este péptido en distintos modelos experimentales; basados en estos estudios y en la vasta experiencia en la construcción de virus recombinantes para su uso en estudios de terapia génica, nos propusimos construir un sistema bidireccional regulable Tet-Off de dos vectores y el sistema de control correspondiente. Dicho vector permitiría regular la expresión de timulina para su empleo en distintos modelos de inflamación. El sistema experimental de dos vectores (ETV) consiste en un RAd que alberga un casete de expresión centrado en un promotor bidireccional Tet-Off flanqueado por un gen sintético para timulina (*metFTS*) y el gen para proteína verde fluorescente humanizada (hGFP). El segundo adenovector de este sistema, RAd-tTA, expresa constitutivamente la proteína reguladora tTA. Cuando las células son co-transducidas por los dos componentes vectoriales, la tTA activa el promotor bidireccional y se expresan ambos transgenes. En presencia del antibiótico doxiciclina (DOX), se desactiva la expresión transgénica. El control del sistema bivectorial, denominado CTV, es similar al ETV, pero solo expresa hGFP.

En el presente capítulo se describe la construcción de esta herramienta molecular que nos permitirá implementar terapia génica antiinflamatoria con timulina. Detallamos también su caracterización *in vitro*, mediante la transducción de diferentes líneas celulares, e *in vivo*, a través de la administración icv o im en ratas. En ambos casos evaluó la expresión de hGFP y, en los animales, los niveles de timulina en LCR o en suero. Se analizó, además, la inhibición de la expresión transgénica luego de la adición de DOX.

### 7.2 Materiales y métodos

#### 7.2.1 Construcción de un sistema bidireccional regulable de dos adenovectores

##### 7.2.1.1 Construcción del plásmido shuttle pDC516-(GFP-TRE-FTS)

Se construyó una variante de nuestro gen sintético *metFTS* (**Reggiani y col. 2006**), que contiene los sitios de endonucleasa de restricción (ER) *Mlu*I y *Eco*RV en sus regiones 5' y 3', respectivamente. Este inserto se clonó en el sitio de clonación múltiple I (MCS I) del vector pBI Tet-Off (Clontech

(Takara), Mountain View, CA), un vector bidireccional de expresión que alberga el elemento regulable TRE flanqueado por dos PminCMV, ubicados en orientaciones opuestas. Posteriormente, se insertó el ADNc de hGFP en el MCS II del plásmido mencionado anteriormente, en el sitio de restricción NotI, verificando la orientación correcta de este paso mediante un mapeo de restricción. El plásmido resultante se denominó pBI- (GFP-TRE-FTS). A partir de allí, el casete GFP-TRE-FTS se escindió con las REs Sall y BgIII y se clonó en los sitios de restricción correspondientes del plásmido pDC516w/p, una versión modificada de pDC516 (Microbix Biosystems Inc., Mississauga, Canadá), removiendo su promotor, pero manteniendo la SV40. Con el fin de proporcionar la segunda señal de poliadenilación a esta construcción, se insertó en los sitios de restricción correspondientes de nuestro plásmido un fragmento de ADN que codifica la SV40, flanqueado por los sitios de restricción para Xhol y XbaI. El constructo final se denominó pDC516-(GFP-TRE-FTS), que aloja el casete bidireccional regulable y la SV40 corriente abajo de ambos transgenes. El plásmido control, denominado pDC516-(GFP-TRE-MCS), se construyó siguiendo el mismo procedimiento, excepto que el MCS I se dejó vacío, obteniendo como resultado un plásmido final que solo expresa hGFP.

#### **7.2.1.2 Construcción del plásmido shuttle pDC515-tTA**

Para construir este plásmido, la secuencia de ADN que codifica la proteína reguladora tTA se escindió del plásmido pTet-Off (Clontech) y se clonó en el MCS del plásmido lanzadera (shuttle) pDC515 (Microbix Biosystems Inc.) utilizando las ERs EcoRI y BamHI.

#### **7.2.1.3 Construcción de los vectores adenovirales recombinantes (RAds)**

Los RAds se construyeron mediante una variante del método de los dos plásmidos (**Hitt y col. 1998**) empleando el kit de plásmidos AdMax® (Microbix, Canadá) como fue descripto por Reggiani y col. (**Reggiani y col. 2006**). Brevemente, el kit contiene un plásmido shuttle (pDC515 o pDC516) que alberga secuencias de reconocimiento de MCS y sitios de reconocimiento (FRT) para la recombinasa de levadura (FLP). El casete está flanqueado por las secuencias de la región E1 del adenovirus tipo 5 (Ad5). El segundo plásmido del kit, el plásmido genómico pBHGfrt (del) E1,3FLP, contiene el genoma completo de Ad5, con delecciones en las regiones E1 y E3. Corriente arriba de la delección E1, este plásmido posee el gen para la recombinasa FLP e inmediatamente después de la delección E1, un sitio de reconocimiento de FRT.

Con el fin de generar los dos RAd de nuestro sistema bivectorial, el plásmido genómico se co-transfектó con el shuttle pDC516-(GFP-TRE-FTS) o el shuttle pDC515-tTA en células HEK 293. En estas células, se expresa la FLP recombinasa que porta el plásmido genómico y cataliza una recombinación específica de sitio del casete de expresión de pDC516-(GFP-TRE-FTS), pDC516-(GFP-TRE-MCS) o pDC515-tTA en el extremo izquierdo de pBHGfrt (del) E1,3FLP, generando así el genoma de los vectores adenovirales recombinantes deseados. Los RAd así generados, denominados RAd-(GFP-TRE-FTS), RAd-(GFP-TRE-MCS) y RAd-tTA se rescataron de los lisados de células HEK 293 y se purificaron en placas para obtener un clon único. Posteriormente se amplificaron los respectivos vectores virales y se purificaron mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Las reservas finales de virus se titularon mediante un ensayo de dilución en serie en placa.

## 7.2.2 Caracterización del sistema *in vitro*

### 7.2.2.1 Optimización de la multiplicidad de infección (MOI)

Con el fin de evaluar el funcionamiento del sistema de dos adenovectores bidireccionales regulable *in vitro*, evaluamos la expresión del gen reportero hGFP a diferentes MOI en las siguientes líneas celulares: mioblastos de músculo de ratón (C2C12), células de glía de rata (B92) y células de ovario de hámster chino (CHO-K1). Estas líneas celulares se usaron y mantuvieron según lo recomendado por la American Type Culture Collection (ATCC). Las MOI (pfu/célula) 0, 12, 36, 100, 500 y 1000, se probaron por triplicado para el sistema bivectoral experimental (ETV: RAd-(GFP-TRE-FTS) + RAd-tTA) y el sistema bivectorial control (CTV: RAd-(GFP-TRE-MCS) + RAd-tTA). En todos los casos, se usaron relaciones iguales de los vectores RAd-tTA y RAd ETV/CTV. El DEx -1, se sembraron  $1,6 \times 10^5$  células en placas de 24 pocillos. El DEx 0, se transdijeron las distintas líneas celulares en medio libre de SFB durante 1,5 hs, meciendo la placa cada 15 min. Al finalizar la incubación con los virus, el medio fue reemplazado por 500  $\mu$ l de medio de mantenimiento, que se conservó hasta el final del experimento. El DEx 2, se tomaron microfotografías de los cultivos y se lisaron las células para cuantificar la expresión de GFP de acuerdo a lo descripto en el **apartado 7.2.4.2**.

### 7.2.2.2 Caracterización de la regulabilidad del sistema

Con el fin de evaluar *in vitro* la regulabilidad del sistema mediante DOX, se usaron células CHO-K1. El DEx -1 las células se sembraron en placas de 12 pocillos y, cuando fue apropiado, se añadió DOX (Clontech) al medio de cultivo a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. El DEx 0, el medio de cultivo se reemplazó por: *a*. medio de cultivo (control negativo para la transducción de virus); *b*. RAd-tTA y RAd-

(GFP-TRE-FTS) en medio de cultivo (control positivo para la expresión de hGFP basal); *c.* RAd-tTA y RAd-(GFP-TRE-FTS) en medio con DOX para evaluar la regulabilidad del sistema y; *d.* RAd-(GFP-TRE-FTS) solo en medio de cultivo (control negativo para la funcionalidad del sistema bivectorial). En todos los casos se utilizó una MOI = 200 para cada adenovector. El día 2, se tomaron microfotografías para observar la fluorescencia de hGFP, se recogió el sobrenadante para determinar la concentración de timulina y se lisaron las células para cuantificar la fluorescencia de GFP.

### **7.2.3 Animales y procedimiento *in vivo***

Se utilizaron ratones machos y hembras jóvenes (4-9 semanas) C57BL/6 y ratas macho SD (3 meses de edad) que fueron criados en nuestras instalaciones para animales (INIBIOLP). Los roedores tuvieron acceso libre a comida y agua y se mantuvieron a 22 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 hs. Todos los experimentos con animales se realizaron siguiendo las Pautas de Bienestar animal del NIH (A5647-01). El protocolo correspondiente fue aprobado por nuestro CICUAL del INIBIOLP, FCM - UNLP (P05-02-2015).

#### **7.2.3.1 Expresión del transgén en músculo esquelético**

En el DEx -14, las ratas fueron timectomizadas y divididas en dos grupos (N = 4): *I- CTV* y *II- ETV*. En el DEx 0, recibieron 0,1 ml de una suspensión que contenía  $1 \times 10^8$  pfu de cada componente del virus CTV o ETV, de acuerdo con el grupo experimental. Con el fin de evaluar los niveles séricos de timulina, se extrajo sangre cada 7 días. El DEx 2, se realizó la eutanasia de un individuo experimental de cada grupo para observar la fluorescencia de hGFP. Con el resto de los animales, se procedió a la eutanasia en del día 49 post inyección de vectores.

#### **7.2.3.2 Regulabilidad de la expresión de timulina en el músculo esquelético**

Los animales se dividieron en dos grupos (N = 5): *I- CTV* y *II- ETV*. El día 0 fueron inyectados por vía im y, posteriormente, se les extrajo sangre cada 5 días de sus venas de la cola hasta el día 25 para evaluar los niveles séricos de timulina. El día 15, se añadió DOX al agua de bebida a una concentración final de 2 mg/ml. Esta preparación se renovó cada 2 días hasta el final del experimento. En el DEx 20, el agua de bebida de las ratas se complementó con  $\beta$ -metasona en una concentración final de 15 mg/l. El objetivo de esta adición de corticoides fue inhibir farmacológicamente la secreción de timulina endógena del timo (**Goya y col. 2003**).

### **7.2.3.3 Expresión de los transgenes en el cerebro**

Los animales se dividieron en dos grupos (N = 4): I- **CTV** y II- **ETV**, en los que se inyectaron bilateralmente en los VL 10  $\mu$ l de una suspensión que contenía  $1 \times 10^9$  pfu de cada componente viral (CTV y ETV). A los tres días, se obtuvo LCR para evaluar los niveles de timulina y luego se procedió a la eutanasia de los animales mediante perfusión intracardiaca, se extrajeron los cerebros y se procesaron para microscopía de fluorescencia. Las muestras de LCR se almacenaron a -80 ° C.

### **7.2.3.4 Estudio temporal de la expresión de hGFP en los ventrículos cerebrales**

Se monitoreó la duración de la expresión de hGFP en el epitelio ependimario de animales timectomizados e inyectados icv con ETV (N = 15). Después de las inyecciones icv, se realizó la eutanasia de tres ratas en los DEx 2, 7, 14, 21 y 28. Sus cerebros fueron procesados para microscopía de fluorescencia.

### **7.2.3.5 Procedimientos quirúrgicos e histológicos**

#### **7.2.3.5.1 Timectomía (Tx)**

Las Tx en ratas se realizaron bajo anestesia con ketamina (40 mg/kg de PC, ip) y xilacina (8 mg/kg de PC, im). Cada animal se coloca de cúbito dorsal de manera de exponer su lado ventral. Se realizó una incisión de 2-2,5 cm en la línea media desde la base del cuello hacia el tórax. Se expuso el timo mediante un corte de 1-1,5 cm en el esternón y se extirpó con un par de fórceps semicurvos. Finalmente, se suturaron los músculos pectorales para cerrar el tórax (**Waynfirth 1980**).

Las Tx en ratones se realizaron bajo anestesia con Avertina (2,2,2 tribromoetanol) (0,4 mg/g de PC, ip). Cada animal fue colocado en posición horizontal exponiendo su torso y se realizó una incisión de 1-1,5 cm en la línea media desde la base del cuello hacia el tórax. Se expuso el timo realizando un corte del esternón de 0,5 cm. Luego, se aspiró el timo con pipeta pasteur ensanchada y conectada a una bomba eléctrica de succión (SILFAB, Silvestrini Fabris SRL, Argentina) y, rápidamente se suturó la incisión. Con el fin de garantizar la ausencia de timulina circulante, se estudiaron animales Tx 14 días después de la cirugía.

#### **7.2.3.5.2 Inyecciones en músculo esquelético**

Los animales se anestesiaron con 2-3 % de isoflurano a una velocidad de flujo de 1,5 l/min de oxígeno y se colocaron ventralmente en la mesa de operaciones con ambos miembros posteriores extendidos

e inmovilizados suavemente. Se rasuró la piel que cubre los músculos tibiales anteriores (TA) de ambas patas; la piel se desinfectó con iodo-povidona tópico y finalmente se hizo una incisión de 1 cm de largo para acceder al compartimento muscular. Se identificó el músculo TA de las patas traseras y se inyectaron 100  $\mu$ l de vector en su porción media.

#### **7.2.3.5.3 Inyecciones estereotáxicas icv**

Las ratas se anestesiaron con ketamina (40 mg/kg de PC, im) y se colocaron en un aparato estereotáxico. Las inyecciones en los VL (10  $\mu$ l de suspensión vectorial, por lado) se realizaron colocando la punta de una aguja de la jeringa Hamilton en las siguientes coordenadas relativas al bregma: -0,8 mm anteroposterior; 4,1 mm dorsoventral y  $\pm$  1,5 mm mediolateral (**Paxinos y Watson 1998**).

#### **7.2.3.5.4 Colección de sangre y LCR**

En diferentes momentos, los animales fueron anestesiados con isoflurano y sus colas sumergidas en agua a 42 °C durante 40-50 s para dilatar los vasos sanguíneos. Se procedió a la extracción de sangre de la vena de la cola con una aguja 22G y se recogieron 2 ml de sangre usando un tubo de Kahn. El LCR se obtuvo mediante punción de la cisterna magna cerebral, como se describió previamente. Las ratas se anestesiaron con ketamina-xilacina y se retiró el LCR con una jeringa de aguja 30G. Con este procedimiento, fue posible obtener 50-100  $\mu$ l de LCR (**Nishida y col. 2011**).

#### **7.2.3.5.5 Procesamiento muscular**

Dos días después de la transducción con nuestro sistema bivectorial, se procedió a la eutanasia de las ratas; los músculos TA se disecaron rápidamente, se lavaron con PB, se fijaron con PFA al 4 % durante 48 hs a 4 °C y se criopreservaron (30 % de sacarosa en 4 % de PB-PFA) durante 3 días a -20 °C. Finalmente, los músculos se incrustaron en un medio de congelación de tejidos (Cryoplast®, Biopack, Buenos Aires, Argentina) y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento. Se obtuvieron secciones longitudinales de 30  $\mu$ m de espesor con un micrótomo de congelación (Leitz 1320, Wetzlar, Alemania) y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Fluoromount G™, Electron Microscopy Sciences, PA, EE. UU.).

### 7.2.3.5.6 Procesamiento cerebral

Los animales se colocaron bajo anestesia profunda y se perfundieron con fijador PB-PFA al 4 % (pH 7,4). Los cerebros se extrajeron y se realizó una post-fijación en PB-PFA al 4 % durante la noche a 4 °C. Se obtuvieron secciones seriadas mediante cortes coronales de 40 µm de espesor con un vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems, Alemania) y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Fluoromount G™, Electron Microscopy Sciences, PA, EE. UU.).

### 7.2.4 Expresión de hGFP

#### 7.2.4.1 Adquisición de imágenes de hGFP por fluorescencia

Las imágenes de cultivo celular se adquirieron con una cámara digital Olympus E-330 unida a un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-71, mientras que la expresión de hGFP en tejido muscular y cerebral se evaluó con un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara de video DP70 CCD. El procesamiento de imágenes posterior se realizó con el software Image-Pro® Plus (Versión 5.1.2, Media Cybernetics, Inc).

#### 7.2.4.2 Cuantificación de hGFP en lisados celulares

Los lisados celulares se obtuvieron de placas de 24 pocillos de la siguiente manera: después de eliminar el medio de cultivo, la monocapa se lavó tres veces con PBS y luego se incubó con 150 µl/pocillo de buffer de lisis (0,1 %, Tritón X-100, EDTA 1 mM en PBS), durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se recogieron los lisados y se centrifugaron durante 1 min a 13.000 rpm. Luego, se añadieron 100 µl/pocillo de sobrenadante limpio en una placa de 96 pocillos Nunc™ MicroWell™ de base óptica y con polímero (Thermo Scientific™, 265301), procediéndose a medir la intensidad de fluorescencia en un lector de placas (Beckman Coulter® DTX 880 Detector multimodo), utilizando el filtro de excitación y emisión (nm) de 485 SL 1 y 535 SL 1, respectivamente. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia arbitrarias.

### 7.2.5 Bioensayo de timulina

La timulina biológicamente activa se midió en cultivos de células y suero mediante un bioensayo de rosetas descripto por Dardenne y Bach (**Dardenne y Bach, 1975**). Este método se basa en la propiedad de la timulina de aumentar la capacidad de la azatioprina (Az) de inhibir la formación de rosetas (**Figura 58**) de glóbulos rojos de carnero sobre esplenocitos de ratón timectomizado. Los sueros o sobrenadantes se filtraron a través de membranas (sistema de micropartición YMT de 30

kDa, PMS-I Amicon Corporation, Denver) y los ultrafiltrados se diluyeron en serie y se incubaron durante 90 min a 37 °C con células de bazo de Ratones C57BL/6 Tx en presencia de 10 µg de Az/ml, concentración que inhibe al 50 % la formación de rosetas en ratones normales, pero no en ratones Tx. A continuación, se dejó que las rosetas se formaran mediante centrifugación con glóbulos rojos de carnero y se contaron en cámara de Neubauer (**Figura 58**) después de una resuspensión suave. La formación de rosetas fue inhibida por la timulina de una manera dosis-dependiente. La actividad inhibidora de las muestras se comparó con la de una curva estándar usando timulina sintética (donada por P. Heinklein, Universidad de Humboldt, Berlín). Los valores se expresaron como concentración de timulina bioactiva en la muestra. La sensibilidad del ensayo es de 1 fg de timulina/ml.



**Figura 58. Microfotografía de una roseta en la cámara de Neubauer.** La flecha señala una roseta formada por glóbulos rojos de carnero sobre esplenocitos de ratón Tx (450X).

### 7.2.6. Análisis estadístico

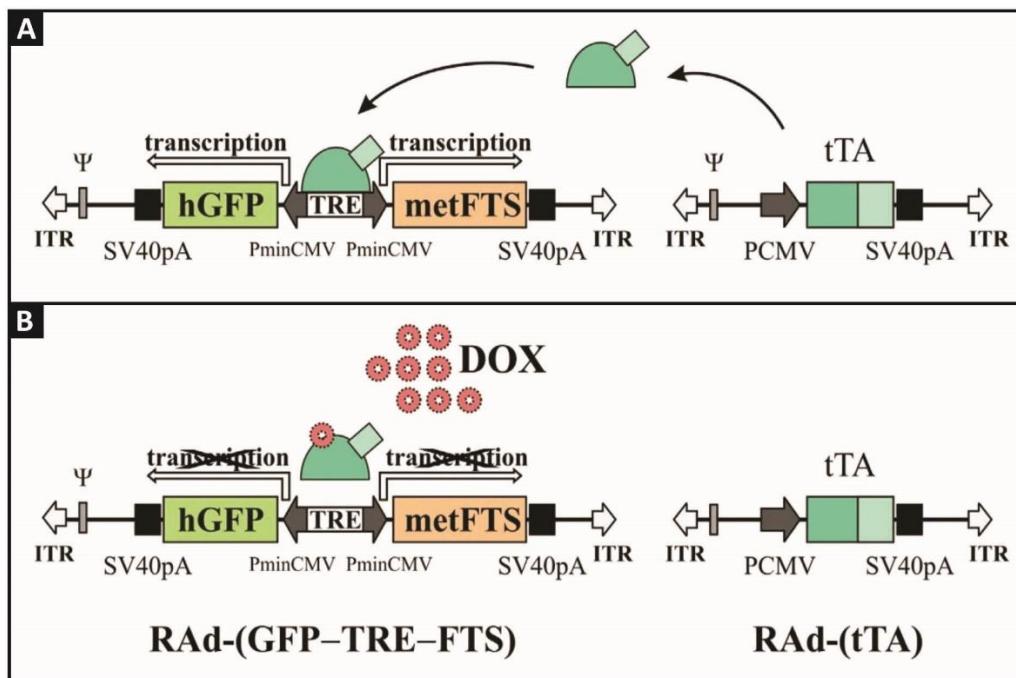
Todos los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones entre los grupos experimentales se realizaron mediante *t*-Test de Student no pareado o ANOVA seguida del test Dunnett, Tukey o Sidak.

## 7.3 Resultados

### 7.3.1 Estructura y función del sistema bivectorial para timulina y hGFP

Construimos un sistema de dos adenovectores basado en la transactivación del casete de expresión bidireccional GFP-TRE-FTS mediante la proteína reguladora tTA que se une al elemento TRE del promotor bidireccional PminCMV-TRE-PminCMV, inactivo *per se*, y activa completamente la expresión de los transgenes FTS y hGFP (**Figura 59.A**). Cuando se agrega DOX al sistema, el antibiótico se une a un sitio alostérico de la proteína tTA induciendo un cambio conformacional que causa la

pérdida de la afinidad de tTA por el elemento TRE. Por lo tanto, la proteína tTA se disocia del promotor, que se vuelve inactivo (Figura 59.B). RAd- (GFP-TRE-FTS), RAd- (GFP-TRE-MCS) y RAd-tTA, por sí solos, son inactivos respecto a la expresión transgénica.



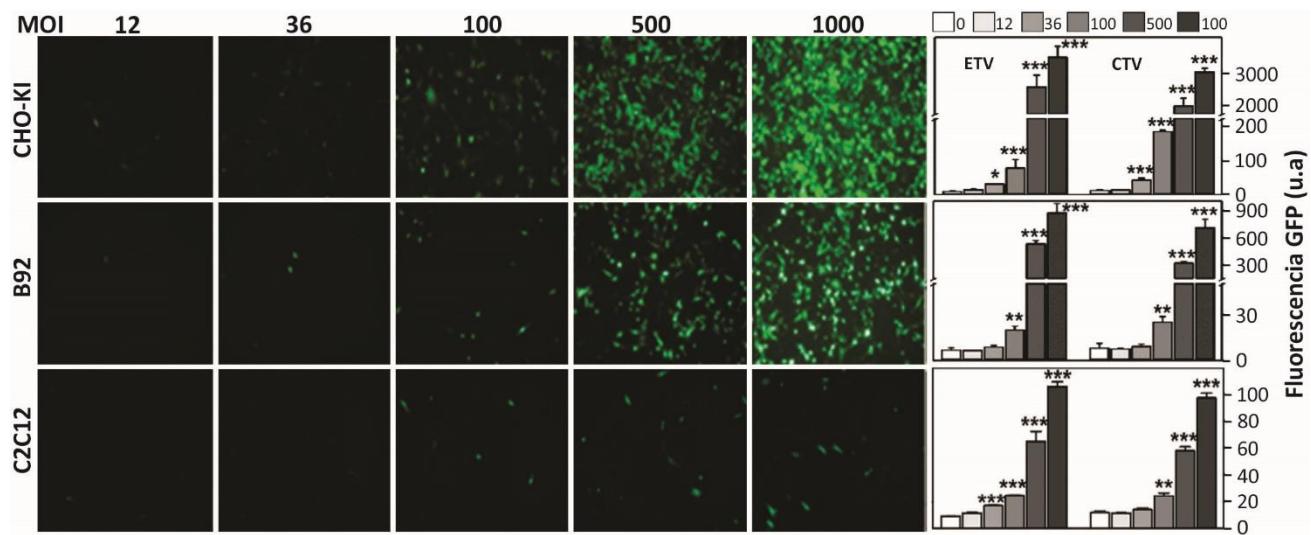
**Figura 59. Esquema del genoma del sistema Tet-Off bidireccional regulable que expresa los genes para hGFP y metFTS.** Consta de dos componentes adenovirales. Un RAd que alberga el cassette de expresión CMV-tTA, que expresa la proteína químérica reguladora tTA (diagrama derecho en A) que se une al elemento TRE del promotor regulable bidireccional de RAd-(GFP-TRE-FTS) (diagrama izquierdo en A) y lo activa, induciendo así la expresión de los transgenes para hGFP y metFTS. El panel A muestra el sistema activo (en ausencia de DOX). Representación del sistema desactivado por DOX (B). Abreviaturas: hGFP, proteína fluorescente verde humanizada; TRE, elemento sensible a la tetraciclina; metFTS, secuencia de codificación metFTS; tTA, proteína químérica reguladora; PminCMV, promotor mínimo del citomegalovirus; SV40pA, señal de poliadenilación del virus simio 40; ITR, repeticiones terminales invertidas;  $\psi$ , señal de empaquetamiento. (Zappa Villar y col., 2017).

### 7.3.2 Caracterización del sistema *in vitro*

#### 7.3.2.1. Optimización de la multiplicidad de infección (MOI)

Se evaluó la expresión de hGFP dependiente de la MOI de los sistemas ETV y CTV en tres líneas celulares: CHO-K1, B92 y C2C12. Las células CHO-K1 fueron las más receptivas a la transducción de virus, seguidas por las células B92. Las células C2C12 fueron más refractarias a la transducción. Esto coincide con estudios anteriores que afirman que los mioblastos C2C12 expresan niveles bajos del receptor de membrana de Ad primario (Kimura y col. 2001). En células CHO-K1 y B92, los niveles de transducción fueron bajos hasta la MOI 36, pero aumentaron significativamente a partir de la MOI

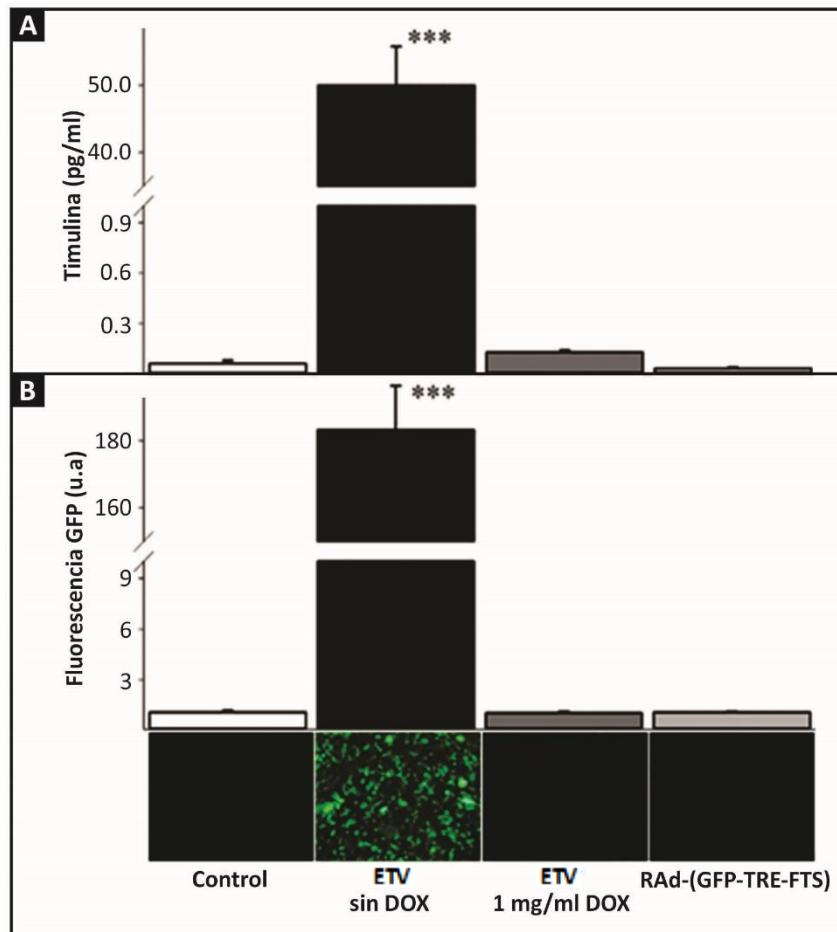
100 (**Figura 60**). Por el contrario, las células C2C12 mostraron un aumento sustancial a partir de la MOI 500.



**Figura 60. Expresión de hGFP dependiente de la MOI en células CHO-K1, B92 y C2C12 transducidas por los sistemas ETV y CTV.** Los paneles izquierdos muestran imágenes de fluorescencia correspondientes a líneas celulares transducidas con el sistema bivectorial experimental (ETV: RAd. (GFP-TRE-FTS) + RAd-tTA) a las MOI indicadas, durante 48 hs (100X). La fluorescencia ETV en células no transducidas (MOI = 0) no mostró fluorescencia (datos no mostrados). Las gráficas en los paneles derechos muestran los niveles de fluorescencia, expresados como unidades arbitrarias (u.a), en los lisados celulares a las MOI indicadas. N = 3. Se realizaron tres experimentos por separado para cada condición. Los datos se expresan como media ± SEM. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 frente al control correspondiente de MOI = 0, analizado por ANOVA de una vía con test de Dunnett post hoc.

### 7.3.2.2. Regulabilidad de timulina y hGFP en cultivos

Se estudió la regulabilidad dependiente de DOX del sistema ETV. En cultivos de células CHO-K1, DOX (1 mg/ml) indujo una inactivación completa del promotor bidireccional Tet-Off, como se muestra por la marcada disminución de timulina en los sobrenadantes celulares y de fluorescencia de hGFP en los lisados celulares (**Figura 61**, paneles superior e inferior, respectivamente). Como era de esperar, RAd- (GFP-TRE-FTS) por si solo está inactivo.



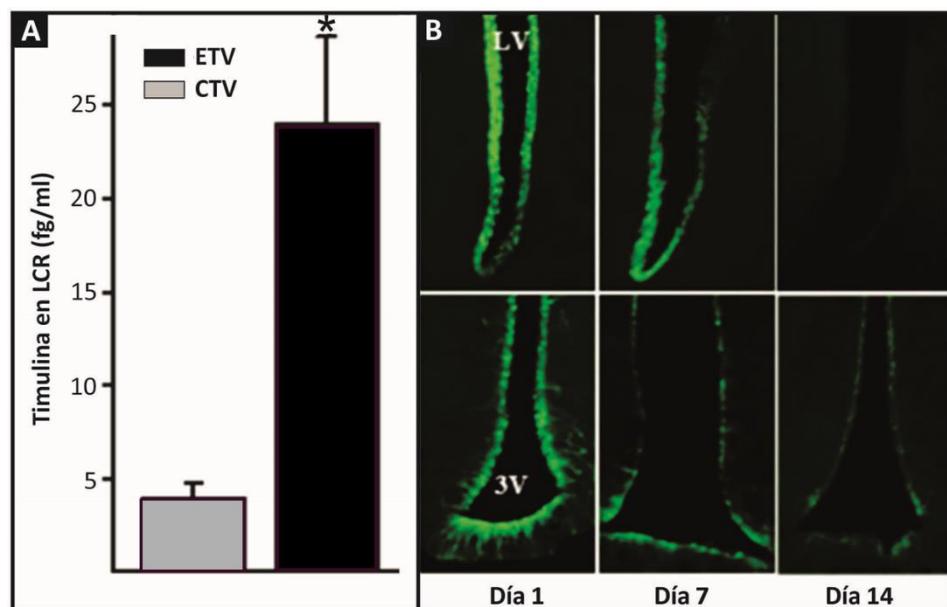
**Figura 61. Expresión de titinina y hGFP *in vitro*.** Los paneles superior e intermedio muestran la cuantificación de la expresión de titinina y hGFP, respectivamente, en cultivos de CHO-K1 expuestos durante dos días a diferentes condiciones experimentales. La concentración de titinina se determinó en los sobrenadantes celulares, mientras que hGFP se evaluó cualitativamente en lisados celulares mediante fluorometría. La DOX inhibió completamente la expresión transgénica (100X). N = 3. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media ± SEM. \*\*\*P < 0,001 versus control no transducido, analizado por ANOVA de una vía con test de Tukey post-hoc. El panel inferior muestra imágenes de fluorescencia verde de células CHO-K1 para cada condición.

### 7.3.3 Caracterización del sistema bivectorial *in vivo*

#### 7.3.3.1 Expresión de titinina y hGFP en el cerebro de la rata

Los niveles de titinina aumentaron marcadamente en el LCR dos días después de la inyección icv de ETV, pero no del sistema CTV (Figura 62.A). Así mismo, los resultados mostraron que el sistema ETV transdujo selectivamente la capa de células ependimarias dos días después de la inyección icv, expresando altos niveles de fluorescencia de hGFP. alcanzando la intensidad máxima en los VL y en

el 3V desde el día 2 hasta el día 7 post inyección, disminuyendo progresivamente después (**Figura 62.B**). En el día 14 post inyección, la fluorescencia de hGFP en la capa de células ependimarias del 3V, pero no de los VL, todavía era detectable. En el día 21 post inyección, la fluorescencia ya no era detectable en los ventrículos cerebrales (**Figura 62.B**).

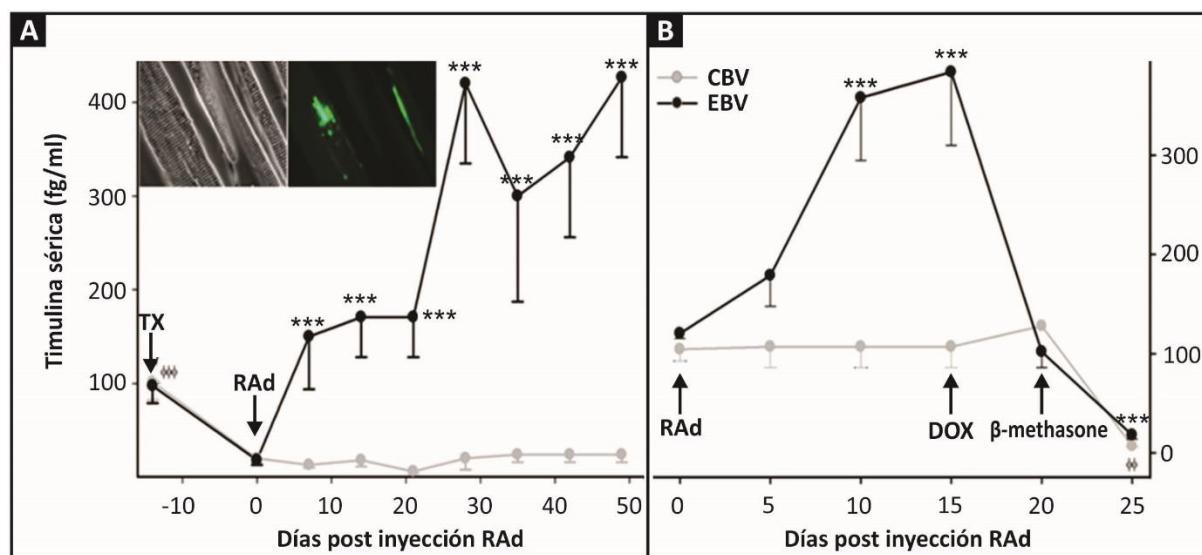


**Figura 62. Expresión cerebral de timulina y hGFP.** Niveles de timulina en el LCR, dos días post inyección de los sistemas CTV y ETV (A). Estudio temporal de la expresión de hGFP (200X) en la capa de células ependimarias de los VL (imágenes superiores) y del 3V (imágenes inferiores) de las ratas inyectadas con el sistema ETV (B). En el 3V, se puede observar la fluorescencia en los procesos de tanicitos transducidos. Abreviaturas: LV, ventrículo lateral; 3V, tercer ventrículo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 versus el correspondiente control CTV inyectado, analizado por el t-test de Student no pareado. N = 4.

### 7.3.3.2. Regulabilidad de la timulina sérica

Como se esperaba, la Tx indujo una fuerte caída en los niveles de timulina circulantes en los animales. La inyección im del sistema ETV en ratas jóvenes Tx indujo un aumento acumulativo en los niveles de timulina sérica que, después del día 10 post inyección, alcanzó valores 300% mayores que en los animales previo a la Tx, permaneciendo en dichos niveles hasta el final del experimento en el día 49 post inyección (último día monitoreado). Los niveles séricos de timulina en las ratas Tx inyectadas con el sistema CTV se mantuvieron prácticamente indetectables a lo largo del experimento (**Figura 63.A**). Cuando el sistema ETV fue administrado im en ratas jóvenes sin Tx, se incrementó la timulina sérica, alcanzando valores máximos alrededor del día 10 post inyección. Al añadir DOX al agua de

bebida, el día 15 post inyección, los niveles de timulina sérica disminuyeron rápidamente, alcanzando valores similares a aquellos previos a la inyección. Cuando se añadió  $\beta$ -metasona al agua de bebida de los mismos animales, en el día 20 post inyección, los niveles basales de timulina disminuyeron rápidamente, alcanzando niveles prácticamente indetectables en el día 25. Las ratas a las que se les injectó el sistema CTV no mostraron cambios en los niveles de timulina hasta que se añadió  $\beta$ -metasona en su agua de bebida, cayendo a niveles prácticamente indetectables en el día 25 (Figura 63.B).



**Figura 63. Estudio temporal de la timulina sérica y su regulabilidad.** Estudio temporal de la timulina sérica recombinante después de la inyección im del sistema ETV y CTV en ratas Tx (A). La Tx y la inyección de RAd se realizaron en los días experimentales -14 y 0, respectivamente (flechas). N = 4. El recuadro muestra la expresión de hGFP en el músculo 2 días post inyección del sistema ETV. La imagen de la izquierda corresponde a microscopía de contraste de fases, mientras que la imagen de la derecha corresponde a microscopía de fluorescencia del mismo campo (200X). Regulabilidad de la timulina sérica recombinante mediante la adición de DOX al agua de bebida (flecha) de ratas jóvenes eutímidicas inyectadas con ETV im (B). La adición de  $\beta$ -metasona al agua de bebida en el día 20 redujo drásticamente los niveles endógenos de timulina sérica. Las ratas inyectadas en el sistema CTV mostraron niveles endógenos de timulina sérica que también fueron inhibidos por el glucocorticoide. N = 5. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM; \*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001 versus el correspondiente punto en el tiempo con la inyección de CTV, analizado por ANOVA de dos vías con medidas repetidas y test de Sidak post hoc.

## 7.4 Discusión

Aunque la posibilidad de implementar la terapia génica de la hormona tímica parece ser una vía interesante en investigación preclínica, ninguno de los genes que codifican los péptidos tímicos conocidos ha sido clonado. En 2002, se sugirió que una posible forma de superar este problema podría ser la construcción de genes "artificiales" que codifiquen aquellos péptidos tímicos cuyas

secuencias de aminoácidos son cortas y no requieren procesamiento postraduccional (**Goya y col. 2002**). Esto se logró para la timulina, cuya secuencia de ADN se clonó inicialmente en un plásmido bacteriano (**Calenda y col. 1988**). Posteriormente, se construyó una secuencia de ADN que codifica el análogo de timulina biológicamente activo *metFTS* y se clonó en un vector adenoviral denominado RAd-*metFTS* (**Reggiani y col. 2006**). Cuando se administró im a ratones y ratas Tx (que poseen niveles no detectables de timulina circulante), RAd-*metFTS* indujo niveles séricos suprafisiológicos sostenidos de timulina biológicamente activa, los cuales permanecieron altos durante al menos 112 días en ratones y hasta 270 días en ratas. La terapia génica neonatal con timulina mostró una eficacia terapéutica significativa en el sistema reproductivo de ratones hembra congénitamente atípicos (**Reggiani y col. 2006**).

Se cree que la inflamación cerebral crónica es una posible causa de neurodegeneración dopaminérgica en la *sustancia nigra* observada en enfermedad de Parkinson (**McGeer y McGeer 2004**). En este contexto, es interesante la búsqueda de compuestos antiinflamatorios activos en el cerebro que sean adecuados para tratamientos a largo plazo, destinados a proteger las neuronas dopaminérgicas de los efectos nocivos de los insultos proinflamatorios. Uno de estos tratamientos podría implicar el uso de timulina, la cual está emergiendo como una prometedora molécula antiinflamatoria. En efecto, la timulina es un péptido inmunomodulador (**Safieh-Garabedian y col. 1992**) que se ha utilizado en el pasado para el tratamiento de ciertas patologías autoinmunes (**Bach, Dardenne y Goldstein, 1984**). Estudios más recientes sugieren que la timulina posee actividad antiinflamatoria en el sistema nervioso central (**Safieh-Garabedian y col. 2003; 2011**).

En el presente estudio, la inyección icv del sistema ETV transdujo selectivamente la capa de células ependimarias y aumentó marcadamente los niveles de timulina en el LCR (**Zappa Villar y col., 2017**). Curiosamente, la expresión mediada por Ad de *metFTS* en la *sustancia nigra* y el hipotálamo de ratas adultas Tx, tuvo una duración significativamente mayor (al menos 90 días) que la expresión mediada por Ad del gen para GFP o  $\beta$ -galactosidasa de *E. Coli* en las mismas regiones cerebrales (**Morel y col. 2006**). Esta observación es consistente con la actividad antiinflamatoria reportada para timulina y un análogo de timulina en el cerebro. Sin embargo, la duración de la expresión de hGFP del sistema ETV fue sustancialmente más corta en las células ependimarias que la duración de la expresión de timulina del RAd-*metFTS* administrado en el parénquima cerebral (**Morel y col. 2006**). La expresión de *met-FTS* por el sistema ETV en el parénquima cerebral aún debe ser evaluada. Consideramos que la diferencia en la duración de la expresión transgénica mediada por Ad probablemente se deba a

una renovación ependimaria normal más que a la inmunogenicidad de nuestro sistema de vector ETV. Por lo tanto, el gen sintético para *metFTS* surge como una herramienta terapéutica potencialmente adecuada para patologías que implican inflamación aguda y crónica del cerebro.

La mayor duración de la expresión de timulina en el músculo probablemente se deba a la actividad antiinflamatoria de la timulina, la cual podría estar evitando que el sistema inmune de los animales inyectados con vector desarrolle una respuesta destructiva contra las células musculares transducidas. El mismo razonamiento podría explicar la persistencia a largo plazo de altas concentraciones de *metFTS* recombinante en la circulación de roedores Tx inyectados con RAd-*metFTS* (**Reggiani y col. 2006**).

Con respecto a esto, debe señalarse que la duración de la transducción y la expresión transgénica es más corta cuando el sistema ETV se administra icv, en comparación con la administración im. Sólo podemos asegurar que se produce una marcada expresión a largo plazo del transgén *met-FTS* en el músculo. Esto sugiere que la terapia génica icv a corto plazo con timulina sería adecuada para una afección inflamatoria aguda, por ejemplo, encefalitis. La administración im, en cambio, sería la mejor opción para una terapia a largo plazo, en base a su mayor duración, dirigida a tratar una patología más bien crónica. La expresión de *met-FTS* en otros tejidos aún necesita ser testeada. En este contexto, el sistema bivectorial regulable que hemos construido constituye una herramienta molecular mejorada para implementar terapia génica con timulina. En efecto, la expresión del reportero hGFP hace innecesario determinar los niveles tisulares de timulina para la confirmación de la funcionalidad del adenovector en el cerebro, el músculo y cualquier otro tejido donde se inyecte el sistema de dos vectores. Esta es una ventaja importante debido a que la timulina es un nonapéptido que se une fácilmente a otras proteínas en los tejidos, lo que genera una interferencia considerable en los ensayos de timulina en extractos de tejidos (**Dardenne y Bach 1975**). Además, el gen reportero permite la identificación precisa de la distribución de las células transducidas en el tejido diana.

La regulabilidad de nuestro sistema bivectorial constituye una segunda ventaja para los tratamientos a largo plazo, ya que permite regular la expresión del transgén según las necesidades de tratamiento. Este control se logra por medio de un procedimiento no invasivo (adición o eliminación de DOX en el agua de bebida). Además, en cultivos celulares, la regulabilidad de la expresión de timulina por DOX puede monitorizarse fácilmente y de forma no invasiva observando los cambios en la fluorescencia

de hGFP en las células tratadas. El sistema *tet* fue probado por primera vez en células de mamíferos (HeLa) por Gossen y Bujard (**Gossen y Bujard 1992**), quienes descubrieron que el sistema era funcional y tuvo una inducción rápida con una captación de tetraciclina eficiente. Dicho sistema resultó ser apropiado para nuestros transgenes (**Zappa Villar y col. 2017**).

## CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En los estudios realizados hemos abordado distintos aspectos patológicos claves en el envejecimiento y el Alzheimer, tanto en el modelo de rata envejecida como en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EA. Además, hemos evaluado el potencial terapéutico de MSCs y de la terapia génica con un factor neuroprotector, el IGF-1, en estos modelos. Por último, hemos avanzado en el conocimiento de la manipulación génica para un abordaje terapéutico antiinflamatorio promisorio con timulina.

Los resultados de los diferentes capítulos han sido discutidos en profundidad previamente; a continuación se pretende hacer una reflexión final resumiendo las conclusiones más importantes obtenidas en este trabajo de Tesis Doctoral.

El tratamiento con hBM-MSCs en las ratas seniles mostró un efecto restaurador más leve que al utilizar dichas células en animales adultos, como lo sugieren los estudios de extensión de vida descritos anteriormente (ver **3.4**). Por lo tanto, parece plausible suponer que las MSCs ejercen una acción estabilizadora sobre la homeostasis cerebral en lugar de un efecto restaurador o rejuvenecedor. Usamos MSCs de médula ósea de donantes adultos; si se hubieran usado hBM-MSCs de donantes más jóvenes o MSCs derivadas de cordón umbilical, los efectos en ratas seniles podrían haber sido más notorios.

Una prioridad de la investigación en la EA es generar buenos modelos animales, mejorando los existentes, para que reflejen adecuadamente la etiología y progresión de la enfermedad y, por tanto, sean de alto valor predictivo. Las diferencias entre la patología humana y la que desarrollan los modelos es una de las principales razones de la pobre traslación de los datos preclínicos en animales a la clínica humana. Una de las mayores carencias de los modelos animales actuales es la escasa o ausente muerte neuronal en las regiones vulnerables a la enfermedad, mientras que en humanos la EA se caracteriza por una extensa pérdida neuronal que se manifiesta en una reducción del volumen cerebral.

En consecuencia, la caracterización de modelos de estudio adecuados es uno de los principales retos biomédicos actuales. Con este fin, nuestro grupo se centró en la caracterización a nivel comportamental y celular del modelo STZ-icv, que simula las características implicadas en el desarrollo del Alzheimer esporádico. Al respecto, resaltamos la diferencia de lesiones inducidas por dosis bajas y altas de STZ en un estudio a corto plazo. Nuestra evidencia reveló que la administración única de una dosis alta de STZ (3 mg/kg) en los VL induce un deterioro severo de la memoria espacial y de reconocimiento junto con cambios morfológicos y bioquímicos en el hipocampo dorsal de la rata, observados 25 días después del tratamiento. A dosis bajas (1 mg/kg), la STZ-icv no afectó significativamente la cognición animal e indujo lesiones moderadas o no detectadas. Además, ambas dosis indujeron una reducción en la complejidad de ramificación de astrocitos. En consecuencia, sugerimos que los mecanismos inducidos con las dos dosis de STZ pueden ser diferentes, lo que resulta en un efecto tóxico agudo desencadenado por la dosis alta o un efecto tóxico parcial causado por la dosis más baja.

Fuimos pioneros en usar el Laberinto de Barnes en el modelo STZ-icv. Esta prueba alternativa al MWM resultó eficiente para evaluar el rendimiento cognitivo de los animales. Además, proponemos a la STZ 3 mg/kg como la dosis de elección para estudiar los síntomas del EAE, posibles terapias y detectar biomarcadores tempranos potenciales en el cerebro de la rata. Por otro lado, proponemos a la STZ 1 mg/kg como la dosis adecuada para evaluar las primeras etapas de la EA y para estudiar el papel de los astrocitos en esta enfermedad.

Un abordaje terapéutico que potencie la neuroprotección abre futuras vías para el desarrollo de nuevas estrategias contra el Alzheimer. Por ello, hemos evaluado la efectividad de la administración iv repetida de hUCPVC en el tratamiento del deterioro del comportamiento y la neurodegeneración causada por la STZ-icv en ratas, a los 3 meses posteriores a la lesión. Nuestros datos demuestran el potencial terapéutico de las MSCs en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EAE al mejorar la reducción del volumen del hipocampo, la pérdida de neuronas maduras y la activación microglial.

Debe destacarse que muchos de los fracasos en fases clínicas están motivados por su aplicación en pacientes en estadios avanzados de la EA, donde el daño neuronal es irreversible. El éxito del estudio de terapia génica mostrado aquí (utilizando el vector RAd-IGF-1) se debe en parte a que ha sido proporcionado antes del inicio de la patología. Por ello, las intervenciones deben ir encaminadas

hacia estadios presintomáticos o prodrómicos de la enfermedad, para lo que se requieren biomarcadores preclínicos y un diagnóstico temprano del Alzheimer como única garantía de acelerar el desarrollo exitoso de una nueva terapia para esta patología.

La expresión mediada por vector de IGF-1 evitó la producción excesiva de EROs y redujo levemente la pérdida de las espinas dendríticas inducida por los O $\beta$ As en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Este efecto puede explicarse parcialmente por una reducción en los O $\beta$ As unidos a las neuronas y, posiblemente, por la reactivación alternativa de la vía de insulina alterada. En ratones, la expresión cerebral de IGF-1 protege contra el deterioro en la memoria de reconocimiento inducido por O $\beta$ As. Estos resultados, junto con resultados previos de nuestro laboratorio en el modelo de rata senil, sugieren que la terapia génica con el RAd-IGF-1 constituye una estrategia neuroprotectora competente.

Un conocimiento más detallado de las rutas neuroinmunes y su implicación en el envejecimiento y la EA puede conducir a un mejor entendimiento y tratamiento de la enfermedad. En esta línea, un número creciente de investigaciones le otorgan a la timulina un rol modulador de la respuesta inflamatoria. Por tanto, la perspectiva de implementar terapia génica para esta hormona constituye una estrategia interesante para modificar el curso de enfermedades inflamatorias.

Con el fin de conseguir un control temporal y cuantitativo de la expresión de nuestro gen sintético para timulina, hemos construido un sistema bivectorial bidireccional regulable Tet-Off. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que nuestros genes de interés (metFTS y GFP) son eficientemente expresados por el sistema bivectorial, mostrando ser activos tanto *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, el sistema Tet-Off en estudio manifestó una eficiente regulación en los experimentos *in vitro* e *in vivo* por el agregado de antibiótico (DOX). Concluimos que nuestro sistema de dos vectores es adecuado para tratamientos a corto y largo plazo en modelos animales (y eventualmente, en humanos) de patologías cerebrales y otras donde la inflamación aguda o crónica desempeña un rol etiopatogénico relevante.

## REFERENCIAS

- Agrawal, Rahul, Bhanvi Mishra, Ethika Tyagi, Chandishwar Nath, y Rakesh Shukla. 2010. «Effect of Curcumin on Brain Insulin Receptors and Memory Functions in STZ (ICV) Induced Dementia Model of Rat». *Pharmacological Research* 61 (3): 247-52. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.008>.
- Agrawal, Rahul, Ethika Tyagi, Rakesh Shukla, y Chandishwar Nath. 2011. «Insulin Receptor Signaling in Rat Hippocampus: A Study in STZ (ICV) Induced Memory Deficit Model». *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 21 (3): 261-73. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.11.009>.
- Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G. M. Cole, N. R. Cooper, y col. 2000. «Inflammation and Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 21 (3): 383-421.
- Alberdi, Elena, M. Victoria Sánchez-Gómez, Fabio Cavaliere, Alberto Pérez-Samartín, José Luis Zugaza, Ramón Trullas, María Domercq, y Carlos Matute. 2010. «Amyloid Beta Oligomers Induce Ca<sup>2+</sup> Dysregulation and Neuronal Death through Activation of Ionotropic Glutamate Receptors». *Cell Calcium* 47 (3): 264-72. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.010>.
- Alzheimer's Association. 2016. «2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12 (4): 459-509.
- Amaducci, L., y G. Tesco. 1994. «Aging as a Major Risk for Degenerative Diseases of the Central Nervous System». *Current Opinion in Neurology* 7 (4): 283-86.
- Amiri, Shayan, Arya Haj-Mirzaian, Majid Momeny, Hossein Amini-Khoei, Maryam Rahimi-Balaei, Simin Poursaman, Mojgan Rastegar, y col. 2017. «Streptozotocin Induced Oxidative Stress, Innate Immune System Responses and Behavioral Abnormalities in Male Mice». *Neuroscience* 340: 373-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.003>.
- Ang, Xiu Min, Michelle H. C. Lee, Anna Blocki, Clarice Chen, L. L. Sharon Ong, H. Harry Asada, Allan Sheppard, y Michael Raghunath. 2014. «Macromolecular Crowding Amplifies Adipogenesis of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Enhancing the pro-Adipogenic Microenvironment». *Tissue Engineering. Part A* 20 (5-6): 966-81. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0337>.
- Aquino, J. B., M. F. Bolontrade, M. G. García, O. L. Podhajcer, y G. Mazzolini. 2010. «Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools and Gene Carriers in Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma». *Gene Therapy* 17 (6): 692-708. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.10>.
- Assis, Ana Carolina M., Juliana L. Carvalho, Bruno A. Jacoby, Raphael L. B. Ferreira, Paula Castanheira, Simone O. F. Diniz, Valbert N. Cardoso, Alfredo M. Goes, y Anderson J. Ferreira. 2010. «Time-Dependent Migration of Systemically Delivered Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Heart». *Cell Transplantation* 19 (2): 219-30. <https://doi.org/10.3727/096368909X479677>.
- Auger, C., J. C. Monier, W. Savino, y M. Dardenne. 1984. «Localization of Thymulin (FTS-Zn) in Mouse Thymus. Comparative Data Using Monoclonal Antibodies Following Different Plastic Embedding Procedures». *Biology of the Cell* 52 (2): 139-46.

- Awasthi, Vibhudutta, Kaustuv Sahoo, Julie Farley, William Sonntag, y Hrushikesh Agashe. 2011. «Assessment of Glucose Metabolism in a Rat Model of Aging». *Journal of Nuclear Medicine* 52 (supplement 1): 1197-1197.
- Bach, Jean-Francois, Mireille Dardenne, Jean-Marie Pleau, y Jean Rosa. 1977. «Biochemical Characterisation of a Serum Thymic Factor». *Nature* 266 (5597): 55-57. <https://doi.org/10.1038/266055a0>.
- Bach, J.F. 1983. «Thymulin (FTS-Zn)». *Allergy* 3, 133-156.
- Bach, J.F., Dardenne, M., y Goldstein, A.L. 1984. «Clinical aspects of thymulin (FTS)». *Goldstein, A.L. (Ed.), Thymic Hormones and Lymphokines, Basic Chemistry and Clinical Applications. Plenum Press, New York*, n.º Goldstein, A.L. (Ed.): 593-600.
- Bach, J.-F., y Mireille Dardenne. 1973. «Studies on thymus products». *Immunology* 25 (3): 353-66.
- Bademli, Kerime, Neslihan Lök, y Alime Selçuk-Tosun. 2018. «The Effect of Reminiscence Therapy on Cognitive Functions, Depression, and Quality of Life in Alzheimer Patients: Randomized Controlled Trial». *International Journal of Geriatric Psychiatry*, septiembre. <https://doi.org/10.1002/gps.4980>.
- Bagyinszky, Eva, Young Chul Youn, Seong Soo A. An, y SangYun Kim. 2014. «The Genetics of Alzheimer's Disease». *Clinical Interventions in Aging* 9: 535-51. <https://doi.org/10.2147/CIA.S51571>.
- Ballard, Clive, Serge Gauthier, Anne Corbett, Carol Brayne, Dag Aarsland, y Emma Jones. 2011. «Alzheimer's Disease». *Lancet (London, England)* 377 (9770): 1019-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9).
- Bantubungi, Kadiombo, David Blum, Laetitia Cuvelier, Sabine Wislet-Gendebien, Bernard Rogister, Emmanuel Brouillet, y Serge N. Schiffmann. 2008. «Stem Cell Factor and Mesenchymal and Neural Stem Cell Transplantation in a Rat Model of Huntington's Disease». *Molecular and Cellular Neurosciences* 37 (3): 454-70. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.11.001>.
- Barbosa da Fonseca, Lea Mirian, Valeria Battistella, Gabriel Rodriguez de Freitas, Bianca Gutfilen, Regina Coeli Dos Santos Goldenberg, Angelo Maiolino, Eduardo Wajnberg, Paulo Henrique Rosado de Castro, Rosalia Mendez-Otero, y Charles Andre. 2009. «Early Tissue Distribution of Bone Marrow Mononuclear Cells after Intra-Arterial Delivery in a Patient with Chronic Stroke». *Circulation* 120 (6): 539-41. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.863084>.
- Barkho, Basam Z., y Xinyu Zhao. 2011. «Adult Neural Stem Cells: Response to Stroke Injury and Potential for Therapeutic Applications». *Current Stem Cell Research & Therapy* 6 (4): 327-38.
- Barnes, C. A. 1979. «Memory Deficits Associated with Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat». *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 93 (1): 74-104.
- Barrett, Graham L., Antoinette Bennie, Jennifer Trieu, Sophie Ping, y Christine Tsafoulis. 2009. «The Chronology of Age-Related Spatial Learning Impairment in Two Rat Strains, as Tested by the Barnes Maze». *Behavioral Neuroscience* 123 (3): 533-38. <https://doi.org/10.1037/a0015063>.
- Barrientos, Ruth M., Matthew G. Frank, Linda R. Watkins, y Steven F. Maier. 2010. «Memory Impairments in Healthy Aging: Role of Aging-Induced Microglial Sensitization». *Aging and Disease* 1 (3): 212-31.
- Bartus, R. T. 2000. «On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis». *Experimental Neurology* 163 (2): 495-529. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7397>.
- Basarkar, Ashwin, y Jagdish Singh. 2007. «Nanoparticulate Systems for Polynucleotide Delivery». *International Journal of Nanomedicine* 2 (3): 353-60.
- Bassani, Taysa B., Joelle M. Turnes, Eric L. R. Moura, Jéssica M. Bonato, Valentín Còppola-Segovia, Silvio M. Zanata, Rúbia M. M. W. Oliveira, y Maria A. B. F. Vital. 2017. «Effects of Curcumin on Short-Term Spatial and Recognition Memory, Adult Neurogenesis and Neuroinflammation in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Dementia of Alzheimer's Type». *Behavioural Brain Research* 335: 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.014>.
- Bassani, Taysa Bervian, Jéssica M. Bonato, Meira M. F. Machado, Valentín Còppola-Segovia, Eric L. R. Moura, Silvio M. Zanata, Rúbia M. M. W. Oliveira, y Maria A. B. F. Vital. 2018. «Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats». *Molecular Neurobiology* 55 (5): 4280-96. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0645-9>.

- Bayo, Juan, Mariano Marrodán, Jorge B. Aquino, Marcelo Silva, Mariana G. García, y Guillermo Mazzolini. 2014. «The Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells on Hepatocellular Carcinoma». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 34 (3): 330-42. <https://doi.org/10.1111/liv.12338>.
- Beas, B. Sofia, Barry Setlow, y Jennifer L. Bizon. 2013. «Distinct Manifestations of Executive Dysfunction in Aged Rats». *Neurobiology of Aging* 34 (9): 2164-74. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.019>.
- Bellienchi, Gian Carlo, Floriana Volpicelli, Valerio Piscopo, Carla Perrone-Capano, y Umberto di Porzio. 2013. «Adult Neural Stem Cells: An Endogenous Tool to Repair Brain Injury?» *Journal of Neurochemistry* 124 (2): 159-67. <https://doi.org/10.1111/jnc.12084>.
- Bellini, Maria J., Claudia B. Hereñú, Rodolfo G. Goya, y Luis M. Garcia-Segura. 2011. «Insulin-like Growth Factor-I Gene Delivery to Astrocytes Reduces Their Inflammatory Response to Lipopolysaccharide». *Journal of Neuroinflammation* 8 (marzo): 21. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-21>.
- Benedict, Christian, William H. Frey, Helgi B. Schiöth, Bernd Schultes, Jan Born, y Manfred Hallschmid. 2011. «Intranasal Insulin as a Therapeutic Option in the Treatment of Cognitive Impairments». *Experimental Gerontology* 46 (2-3): 112-15. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.026>.
- Benedict, Christian, Manfred Hallschmid, Astrid Hatke, Bernd Schultes, Horst L. Fehm, Jan Born, y Werner Kern. 2004. «Intranasal Insulin Improves Memory in Humans». *Psychoneuroendocrinology* 29 (10): 1326-34. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.04.003>.
- Benihoud, K., P. Yeh, y M. Perricaudet. 1999. «Adenovirus Vectors for Gene Delivery». *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5): 440-47.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Drogue, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, y R. W. Finberg. 1997. «Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5». *Science (New York, N.Y.)* 275 (5304): 1320-23.
- Bergen, Jamie M., In-Kyu Park, Philip J. Horner, y Suzie H. Pun. 2008. «Nonviral Approaches for Neuronal Delivery of Nucleic Acids». *Pharmaceutical Research* 25 (5): 983-98. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9439-5>.
- Bernhardi, Rommy von, Laura Eugenín-von Bernhardi, y Jaime Eugenín. 2015. «Microglial Cell Dysregulation in Brain Aging and Neurodegeneration». *Frontiers in Aging Neuroscience* 7: 124. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00124>.
- Biasibetti, Regina, Ana Carolina Tramontina, Ana Paula Costa, Márcio Ferreira Dutra, André Quincozes-Santos, Patrícia Nardin, Caren Luciane Bernardi, Krista Minéia Wartchow, Paula Santana Lunardi, y Carlos-Alberto Gonçalves. 2013. «Green Tea (-)Epigallocatechin-3-Gallate Reverses Oxidative Stress and Reduces Acetylcholinesterase Activity in a Streptozotocin-Induced Model of Dementia». *Behavioural Brain Research* 236 (1): 186-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.039>.
- Biessels, G. J., L. J. Kappelle, y Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. 2005. «Increased Risk of Alzheimer's Disease in Type II Diabetes: Insulin Resistance of the Brain or Insulin-Induced Amyloid Pathology?» *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 5): 1041-44. <https://doi.org/10.1042/BST20051041>.
- Bingham, Emma M., David Hopkins, Diarmuid Smith, Andrew Pernet, William Hallett, Laurence Reed, Paul K. Marsden, y Stephanie A. Amiel. 2002. «The Role of Insulin in Human Brain Glucose Metabolism: An 18fluoro-Deoxyglucose Positron Emission Tomography Study». *Diabetes* 51 (12): 3384-90.
- Bland, Sondra T., Jacob T. Beckley, Sarah Young, Verne Tsang, Linda R. Watkins, Steven F. Maier, y Staci D. Bilbo. 2010. «Enduring Consequences of Early-Life Infection on Glial and Neural Cell Genesis within Cognitive Regions of the Brain». *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (3): 329-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.09.012>.
- Blokland, A., y J. Jolles. 1993a. «Spatial Learning Deficit and Reduced Hippocampal ChAT Activity in Rats after an ICV Injection of Streptozotocin». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 44 (2): 491-94.
- 1993b. «Spatial Learning Deficit and Reduced Hippocampal ChAT Activity in Rats after an ICV Injection of Streptozotocin». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 44 (2): 491-94.

- Blundell, T. L., y R. E. Humbel. 1980. «Hormone Families: Pancreatic Hormones and Homologous Growth Factors». *Nature* 287 (5785): 781-87.
- Blurton-Jones, Mathew, Masashi Kitazawa, Hilda Martinez-Coria, Nicholas A. Castello, Franz-Josef Müller, Jeanne F. Loring, Tritia R. Yamasaki, Wayne W. Poon, Kim N. Green, y Frank M. LaFerla. 2009. «Neural Stem Cells Improve Cognition via BDNF in a Transgenic Model of Alzheimer Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (32): 13594-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901402106>.
- Bobinski, M., M. J. de Leon, M. Tarnawski, J. Wegiel, B. Reisberg, D. C. Miller, y H. M. Wisniewski. 1998. «Neuronal and Volume Loss in CA1 of the Hippocampal Formation Uniquely Predicts Duration and Severity of Alzheimer Disease». *Brain Research* 805 (1-2): 267-69.
- Bogdanova, Olena V., Shami Kanekar, Kristen E. D'Anci, y Perry F. Renshaw. 2013. «Factors Influencing Behavior in the Forced Swim Test». *Physiology & Behavior* 118 (junio): 227-39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.012>.
- Bokare, Anand M., Mandar Bhone, Rajan Goel, y Yogendra Nayak. 2018. «5-HT6 Receptor Agonist and Antagonist Modulates ICV-STZ-Induced Memory Impairment in Rats». *Psychopharmacology* 235 (5): 1557-70. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4866-z>.
- Bomfim, Theresa R., Letícia Forny-Germano, Luciana B. Sathler, Jordano Brito-Moreira, Jean-Christophe Houzel, Helena Decker, Michael A. Silverman, y col. 2012. «An Anti-Diabetes Agent Protects the Mouse Brain from Defective Insulin Signaling Caused by Alzheimer's Disease- Associated A $\beta$  Oligomers». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (4): 1339-53. <https://doi.org/10.1172/JCI57256>.
- Bondy, C, y Wh Lee. 1993. «Correlation between Insulin-like Growth Factor (IGF)-Binding Protein 5 and IGF-I Gene Expression during Brain Development». *The Journal of Neuroscience* 13 (12): 5092-5104. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-12-05092.1993>.
- Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells - stemcells.nih.gov. 2018. [https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative\\_Medicine/2006Chapter2.htm](https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006Chapter2.htm).
- Bordigoni, P., G. Faure, M. C. Bene, M. Dardenne, J. F. Bach, J. Duheille, y D. Olive. 1982. «Improvement of Cellular Immunity and IgA Production in Immunodeficient Children after Treatment with Synthetic Serum Thymic Factor (FTS)». *Lancet (London, England)* 2 (8293): 293-97.
- Breese, C. R., A. D'Costa, Y. D. Rollins, C. Adams, R. M. Booze, W. E. Sonntag, y S. Leonard. 1996. «Expression of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) and IGF-Binding Protein 2 (IGF-BP2) in the Hippocampus Following Cytotoxic Lesion of the Dentate Gyrus». *The Journal of Comparative Neurology* 369 (3): 388-404. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960603\)369:3<388::AID-CNE5>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960603)369:3<388::AID-CNE5>3.0.CO;2-1).
- Broekkamp CL, Jenck F. 1989. «The relationship between various animal models of anxiety, fear-related psychiatric symptoms and response to serotonergic drugs». *Behavioural pharmacology of 5-HT. Hillsdale' Erlbaum*, 321 – 35.
- Bronzuoli, Maria Rosanna, Aniello Iacomino, Luca Steardo, y Caterina Scuderi. 2016. «Targeting Neuroinflammation in Alzheimer's Disease». *Journal of Inflammation Research* 9: 199-208. <https://doi.org/10.2147/JIR.S86958>.
- Brooker, G. J., M. Kalloniatis, V. C. Russo, M. Murphy, G. A. Werther, y P. F. Bartlett. 2000. «Endogenous IGF-1 Regulates the Neuronal Differentiation of Adult Stem Cells». *Journal of Neuroscience Research* 59 (3): 332-41.
- Brown, O. A., Y. E. Sosa, M. Dardenne, J. M. Pléau, y R. G. Goya. 2000. «Studies on the Gonadotropin-Releasing Activity of Thymulin: Changes with Age». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 55 (4): B170-176.
- Broxmeyer, Hal E., Edward Srour, Christie Orschell, David A. Ingram, Scott Cooper, P. Artur Plett, Laura E. Mead, y Mervin C. Yoder. 2006. «Cord Blood Stem and Progenitor Cells». *Methods in Enzymology* 419: 439-73. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19018-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19018-7).
- Brüning, J. C., D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Müller-Wieland, y C. R. Kahn. 2000. «Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction». *Science (New York, N.Y.)* 289 (5487): 2122-25.

- Brywe, Katarina G., Carina Mallard, Malin Gustavsson, Maj Hedtjärn, Anna-Lena Leverin, Xiaoyang Wang, Klas Blomgren, Jörgen Isgaard, y Henrik Hagberg. 2005. «IGF-I Neuroprotection in the Immature Brain after Hypoxia-Ischemia, Involvement of Akt and GSK3beta?» *The European Journal of Neuroscience* 21 (6): 1489-1502. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03982.x>.
- Calenda, Alphonse, Agnès Cordonnier, Florence Lederer, Diep K. H. Le, y Jean Marie Pleau. 1988. «Production of Biologically Active Thymulin in Escherichia Coli through Expression of a Chemically Synthesized Gene». *Biotechnology Letters* 10 (3): 155-60. <https://doi.org/10.1007/BF01134818>.
- Calon, Frédéric, Giselle P. Lim, Fusheng Yang, Takashi Morihara, Bruce Teter, Oliver Ubeda, Phillippe Rostaing, y col. 2004. «Docosahexaenoic Acid Protects from Dendritic Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model». *Neuron* 43 (5): 633-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.013>.
- Camandola, Simonetta, y Mark P. Mattson. 2017. «Brain Metabolism in Health, Aging, and Neurodegeneration». *The EMBO Journal* 36 (11): 1474-92. <https://doi.org/10.1525/embj.201695810>.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono, y N. M. Fisk. 2001. «Identification of Mesenchymal Stem/Progenitor Cells in Human First-Trimester Fetal Blood, Liver, and Bone Marrow». *Blood* 98 (8): 2396-2402.
- Campos, Samuel K., y Michael A. Barry. 2007. «Current Advances and Future Challenges in Adenoviral Vector Biology and Targeting». *Current Gene Therapy* 7 (3): 189-204.
- Cao, Ning, Tuling Liao, Jiajing Liu, Zeng Fan, Quan Zeng, Junnian Zhou, Haiyun Pei, y col. 2017. «Clinical-Grade Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Reverse Cognitive Aging via Improving Synaptic Plasticity and Endogenous Neurogenesis». *Cell Death & Disease* 8 (8): e2996. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.316>.
- Caplan, A. I. 2009. «Why Are MSCs Therapeutic? New Data: New Insight». *The Journal of Pathology* 217 (2): 318-24. <https://doi.org/10.1002/path.2469>.
- Caplan, Arnold I., y James E. Dennis. 2006. «Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators». *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (5): 1076-84. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>.
- Carro, E., J. L. Trejo, A. Gerber, H. Loetscher, J. Torrado, F. Metzger, y I. Torres-Aleman. 2006. «Therapeutic Actions of Insulin-like Growth Factor I on APP/PS2 Mice with Severe Brain Amyloidosis». *Neurobiology of Aging* 27 (9): 1250-57. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.06.015>.
- Castellani, Rudy J., Raj K. Rolston, y Mark A. Smith. 2010. «Alzheimer Disease». *Disease-a-Month: DM* 56 (9): 484-546. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>.
- Castro, Ana, Santiago Conde, M. Isabel Rodriguez-Franco, y Ana Martinez. 2002. «Non-Cholinergic Pharmacotherapy Approaches to the Future Treatment of Alzheimer's Disease». *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2 (1): 37-50.
- Castro-Muñozledo, Federico. 2013. «Review: Corneal Epithelial Stem Cells, Their Niche and Wound Healing». *Molecular Vision* 19: 1600-1613.
- Catacchio, Ivana, Simona Berardi, Antonia Reale, Annunziata De Luisi, Vito Racanelli, Angelo Vacca, y Roberto Ria. 2013. «Evidence for Bone Marrow Adult Stem Cell Plasticity: Properties, Molecular Mechanisms, Negative Aspects, and Clinical Applications of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Transdifferentiation». *Stem Cells International* 2013: 589139. <https://doi.org/10.1155/2013/589139>.
- Chakrabarti, S., M. Sinha, I. G. Thakurta, P. Banerjee, y M. Chattopadhyay. 2013. «Oxidative Stress and Amyloid Beta Toxicity in Alzheimer's Disease: Intervention in a Complex Relationship by Antioxidants». *Current Medicinal Chemistry* 20 (37): 4648-64.
- Chakrabarti, Sasanka, Vineet Kumar Khemka, Anindita Banerjee, Gargi Chatterjee, Anirban Ganguly, y Atanu Biswas. 2015. «Metabolic Risk Factors of Sporadic Alzheimer's Disease: Implications in the Pathology, Pathogenesis and Treatment». *Aging and Disease* 6 (4): 282-99. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.002>.
- Chakrabarti, Sasanka, Soumyabrata Munshi, Kalpita Banerjee, Ishita Guha Thakurta, Maitrayee Sinha, y Maria Bindu Bagh. 2011. «Mitochondrial Dysfunction during Brain Aging: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidant Supplementation». *Aging and Disease* 2 (3): 242-56.

- Cherry, Jonathan D., John A. Olschowka, y M. Kerry O'Banion. 2014. «Neuroinflammation and M2 Microglia: The Good, the Bad, and the Inflamed». *Journal of Neuroinflammation* 11 (junio): 98. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>.
- Chiu, Shu-Ling, Chih-Ming Chen, y Hollis T. Cline. 2008. «Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function in Vivo». *Neuron* 58 (5): 708-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.014>.
- Cho, Y. H., H. S. Kim, K. H. Lee, Y. E. Lee, y J. W. Chang. 2006. «The Behavioral Effect of Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Cold Brain Injured Rats». *Acta Neurochirurgica. Supplement* 99: 125-32.
- Cholerton, B., L. D. Baker, y S. Craft. 2011. «Insulin Resistance and Pathological Brain Ageing». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 28 (12): 1463-75. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03464.x>.
- Chopra, Hitesh, Manoj Kumar Hans, y Shashit Shetty. 2013. «Stem Cells-the Hidden Treasure: A Strategic Review». *Dental Research Journal* 10 (4): 421-27.
- Christie, Kimberly J., y Ann M. Turnley. 2012. «Regulation of Endogenous Neural Stem/Progenitor Cells for Neural Repair-Factors That Promote Neurogenesis and Gliogenesis in the Normal and Damaged Brain». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 6: 70. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00070>.
- Chu, Wen-Zheng, y Cai-Yun Qian. 2005. «[Expressions of Abeta1-40, Abeta1-42, tau202, tau396 and tau404 after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats]». *Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA* 25 (2): 168-70, 173.
- Clark, R. E., S. M. Zola, y L. R. Squire. 2000. «Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (23): 8853-60.
- Clemmons, David R. 1990. «Insulinlike Growth Factor Binding Proteins». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 1 (8): 412-17. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(90\)90102-9](https://doi.org/10.1016/1043-2760(90)90102-9).
- Colombo, J. A., B. Quinn, y V. Puissant. 2002. «Disruption of Astroglial Interlaminar Processes in Alzheimer's Disease». *Brain Research Bulletin* 58 (2): 235-42.
- Colonna, Marco, y Oleg Butovsky. 2017. «Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration». *Annual Review of Immunology* 35: 441-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>.
- Connor, B., E. J. Beilharz, C. Williams, B. Synek, P. D. Gluckman, R. L. Faull, y M. Dragunow. 1997. «Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Immunoreactivity in the Alzheimer's Disease Temporal Cortex and Hippocampus». *Brain Research. Molecular Brain Research* 49 (1-2): 283-90. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00192-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00192-7).
- Consolini, R, A Legitimo, A Calleri, y M Milani. 2000. «Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life». *Clinical and Experimental Immunology* 121 (3): 444-47. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01315.x>.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, N. J. Risch, W. J. Strittmatter, D. E. Schmeichel, P. C. Gaskell, J. B. Rimmier, P. A. Locke, P. M. Conneally, y K. E. Schmader. 1994. «Protective Effect of Apolipoprotein E Type 2 Allele for Late Onset Alzheimer Disease». *Nature Genetics* 7 (2): 180-84. <https://doi.org/10.1038/ng0694-180>.
- Crigler, Lauren, Rebecca C. Robey, Amy Asawachaicharn, Dina Gaupp, y Donald G. Phinney. 2006. «Human Mesenchymal Stem Cell Subpopulations Express a Variety of Neuro-Regulatory Molecules and Promote Neuronal Cell Survival and Neuritogenesis». *Experimental Neurology* 198 (1): 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.10.029>.
- Crystal, Ronald G. 2014. «Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector». *Human Gene Therapy* 25 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.2527>.
- Cummings, Jeffrey L. 2004. «Alzheimer's Disease». *The New England Journal of Medicine* 351 (1): 56-67. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040223>.
- Cung, M. T., M. Marraud, P. Lefrancier, M. Dardenne, J. F. Bach, y J. P. Laussac. 1988. «NMR Study of a Lymphocyte Differentiating Thymic Factor. An Investigation of the Zn(II)-Nonapeptide Complexes (Thymulin)». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (12): 5574-80.

- Cunnane, Stephen, Scott Nugent, Maggie Roy, Alexandre Courchesne-Loyer, Etienne Croteau, Sébastien Tremblay, Alex Castellano, y col. 2011. «Brain Fuel Metabolism, Aging, and Alzheimer's Disease». *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.) 27 (1): 3-20. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.021>.
- Dardenne, M., y Bach, J.F. 1975. «The sheep cell rosette assay for the evaluation of thymic hormones». *Van Bekkum, D.W., Kruisbeek, A.M. (Eds.), Biological Activity of Thymic Hormones, International Workshop and Symposium. Kooyker Scientific Publications, Halsted Press Division, Wiley, Rotterdam*, 235–243.
- Dardenne, M., J. M. Pléau, B. Nabarra, P. Lefrancier, M. Derrien, J. Choay, y J. F. Bach. 1982. «Contribution of Zinc and Other Metals to the Biological Activity of the Serum Thymic Factor». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (17): 5370-73.
- Daviglus, Martha L., Brenda L. Plassman, Amber Pirzada, Carl C. Bell, Phyllis E. Bowen, James R. Burke, E. Sander Connolly, y col. 2011. «Risk Factors and Preventive Interventions for Alzheimer Disease: State of the Science». *Archives of Neurology* 68 (9): 1185-90. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.100>.
- Davison, Andrew J., Mária Benko, y Balázs Harrach. 2003. «Genetic Content and Evolution of Adenoviruses». *The Journal of General Virology* 84 (Pt 11): 2895-2908. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19497-0>.
- Davoli, M. A., J. Fourtounis, J. Tam, S. Xanthoudakis, D. Nicholson, G. S. Robertson, G. Y. K. Ng, y D. Xu. 2002. «Immunohistochemical and Biochemical Assessment of Caspase-3 Activation and DNA Fragmentation Following Transient Focal Ischemia in the Rat». *Neuroscience* 115 (1): 125-36.
- De Boer, Sietse F., y Jaap M. Koolhaas. 2003. «Defensive Burying in Rodents: Ethology, Neurobiology and Psychopharmacology». *European Journal of Pharmacology* 463 (1-3): 145-61.
- De Felice, Fernanda G. 2013. «Alzheimer's Disease and Insulin Resistance: Translating Basic Science into Clinical Applications». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2): 531-39. <https://doi.org/10.1172/JCI64595>.
- De Felice, Fernanda G., Pauline T. Velasco, Mary P. Lambert, Kirsten Viola, Sara J. Fernandez, Sergio T. Ferreira, y William L. Klein. 2007. «Abeta Oligomers Induce Neuronal Oxidative Stress through an N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Mechanism That Is Blocked by the Alzheimer Drug Memantine». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (15): 11590-601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607483200>.
- De Felice, Fernanda G., Marcelo N. N. Vieira, Theresa R. Bomfim, Helena Decker, Pauline T. Velasco, Mary P. Lambert, Kirsten L. Viola, Wei-Qin Zhao, Sergio T. Ferreira, y William L. Klein. 2009. «Protection of Synapses against Alzheimer's-Linked Toxins: Insulin Signaling Prevents the Pathogenic Binding of Abeta Oligomers». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6): 1971-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809158106>.
- De Felice, Fernanda G., Diana Wu, Mary P. Lambert, Sara J. Fernandez, Pauline T. Velasco, Pascale N. Lacor, Eileen H. Bigio, y col. 2008. «Alzheimer's Disease-Type Neuronal Tau Hyperphosphorylation Induced by A Beta Oligomers». *Neurobiology of Aging* 29 (9): 1334-47. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029>.
- De Laporte, Laura, Jennifer Cruz Rea, y Lonnie D. Shea. 2006. «Design of modular non-viral gene therapy vectors». *Biomaterials* 27 (7): 947-54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.036>.
- Deacon, Robert M. J., y J. Nicholas P. Rawlins. 2005. «Hippocampal Lesions, Species-Typical Behaviours and Anxiety in Mice». *Behavioural Brain Research* 156 (2): 241-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.027>.
- Deary, Ian J., Janie Corley, Alan J. Gow, Sarah E. Harris, Lorna M. Houlihan, Riccardo E. Marioni, Lars Penke, Snorri B. Rafnsson, y John M. Starr. 2009. «Age-Associated Cognitive Decline». *British Medical Bulletin* 92: 135-52. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldp033>.
- Della Sala G, Putignano E, Chelini G, Melani R, Calcagno E, Ratto GM, Amendola E, Gross CT, Giustetto M, y Pizzorusso T. 2016. «Dendritic Spine Instability in a Mouse Model of CDKL5 Disorder Is Rescued by Insulin-like Growth Factor 1». *Biological Psychiatry* 80 (4): 302-11. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.028>.
- Dementia - OMS, 2018. World Health Organization. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

- D'Ercole, A. J., A. D. Stiles, y L. E. Underwood. 1984. «Tissue Concentrations of Somatomedin C: Further Evidence for Multiple Sites of Synthesis and Paracrine or Autocrine Mechanisms of Action». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (3): 935-39.
- Deshmukh, Rahul, Madhu Kaundal, Vikas Bansal, y null Samardeep. 2016. «Caffeic Acid Attenuates Oxidative Stress, Learning and Memory Deficit in Intra-Cerebroventricular Streptozotocin Induced Experimental Dementia in Rats». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 81 (julio): 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.017>.
- Detke, M. J., M. Rickels, y I. Lucki. 1995. «Active Behaviors in the Rat Forced Swimming Test Differentially Produced by Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants». *Psychopharmacology* 121 (1): 66-72.
- Dhar, Deepali, y John Hsi-En Ho. 2009. «Stem Cell Research Policies around the World». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 82 (3): 113-15.
- Dhikav, Vikas, y Kuljeet Anand. 2011. «Potential Predictors of Hippocampal Atrophy in Alzheimer's Disease». *Drugs & Aging* 28 (1): 1-11. <https://doi.org/10.2165/11586390-000000000-00000>.
- Di Carlo, M., P. Picone, R. Carrotta, D. Giacomazza, y P. L. San Biagio. 2010. «Insulin Promotes Survival of Amyloid-Beta Oligomers Neuroblastoma Damaged Cells via Caspase 9 Inhibition and Hsp70 Upregulation». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/147835>.
- Diz-Chaves, Yolanda, Olga Pernía, Paloma Carrero, y Luis M. Garcia-Segura. 2012. «Prenatal Stress Causes Alterations in the Morphology of Microglia and the Inflammatory Response of the Hippocampus of Adult Female Mice». *Journal of Neuroinflammation* 9 (abril): 71. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-71>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, y Em Horwitz. 2006. «Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement». *Cytotherapy* 8 (4): 315-17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Donega, Vanessa, Cora H. Nijboer, Geralda van Tilborg, Rick M. Dijkhuizen, Annemieke Kavelaars, y Cobi J. Heijnen. 2014. «Intranasally Administered Mesenchymal Stem Cells Promote a Regenerative Niche for Repair of Neonatal Ischemic Brain Injury». *Experimental Neurology* 261 (noviembre): 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.009>.
- Donega, Vanessa, Cindy T. J. van Velthoven, Cora H. Nijboer, Annemieke Kavelaars, y Cobi J. Heijnen. 2013. «The Endogenous Regenerative Capacity of the Damaged Newborn Brain: Boosting Neurogenesis with Mesenchymal Stem Cell Treatment». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (5): 625-34. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.3>.
- Dong, Mei-Xue, Chen-Meng Li, Peng Shen, Qing-Chuan Hu, You-Dong Wei, Yi-Fei Ren, Jia Yu, y col. 2018. «Recombinant Tissue Plasminogen Activator Induces Long-Term Anxiety-like Behaviors via the ERK1/2-GAD1-GABA Cascade in the Hippocampus of a Rat Model». *Neuropharmacology* 128 (enero): 119-31. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.039>.
- Donovan, P. J., y J. Gearhart. 2001. «The End of the Beginning for Pluripotent Stem Cells». *Nature* 414 (6859): 92-97. <https://doi.org/10.1038/35102154>.
- Donzis, Elissa J., y Natalie C. Tronson. 2014. «Modulation of Learning and Memory by Cytokines: Signaling Mechanisms and Long Term Consequences». *Neurobiology of Learning and Memory* 115 (noviembre): 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.008>.
- Doré, S., S. Kar, y R. Quirion. 1997. «Insulin-like Growth Factor I Protects and Rescues Hippocampal Neurons against Beta-Amyloid- and Human Amylin-Induced Toxicity». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9): 4772-77.
- Dos Santos, João Paulo Almeida, Adriana Vizuete, Fernanda Hansen, Regina Biasibetti, y Carlos-Alberto Gonçalves. 2018. «Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 61 (1): 237-49. <https://doi.org/10.3233/JAD-170211>.

- Dou, Jing-Tao, Min Chen, Franck Dufour, Daniel L. Alkon, y Wei-Qin Zhao. 2005. «Insulin Receptor Signaling in Long-Term Memory Consolidation Following Spatial Learning». *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 12 (6): 646-55. <https://doi.org/10.1101/lm.88005>.
- Dringenberg, Hans C., Yonina Levine, y Janet L. Menard. 2008. «Electrical Stimulation of Dorsal, but Not Ventral Hippocampus Reduces Behavioral Defense in the Elevated plus Maze and Shock-Probe Burying Test in Rats». *Behavioural Brain Research* 186 (1): 143-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.030>.
- Drommelschmidt, Karla, Meray Serdar, Ivo Bendix, Josephine Herz, Frederik Bertling, Sebastian Prager, Matthias Keller, y col. 2017. «Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Ameliorate Inflammation-Induced Preterm Brain Injury». *Brain, Behavior, and Immunity* 60 (febrero): 220-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.011>.
- Duelli, R., H. Schröck, W. Kuschinsky, y S. Hoyer. 1994. «Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin Induces Discrete Local Changes in Cerebral Glucose Utilization in Rats». *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 12 (8): 737-43.
- Dumas, Julie A., y Paul A. Newhouse. 2011. «The Cholinergic Hypothesis of Cognitive Aging Revisited Again: Cholinergic Functional Compensation». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 99 (2): 254-61. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.02.022>.
- Duyckaerts, C., Delatour B. y Potier M.C. 2009. «Classification and Basic Pathology of Alzheimer Disease». *Acta Neuropathologica* 118 (1): 5-36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>.
- Ebert, Allison D., Amy J. Beres, Amelia E. Barber, y Clive N. Svendsen. 2008. «Human Neural Progenitor Cells Over-Expressing IGF-1 Protect Dopamine Neurons and Restore Function in a Rat Model of Parkinson's Disease». *Experimental Neurology* 209 (1): 213-23. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.09.022>.
- Elgh, Eva, Ann Lindqvist Astot, Markku Fagerlund, Sture Eriksson, Tommy Olsson, y Birgitta Näsman. 2006. «Cognitive Dysfunction, Hippocampal Atrophy and Glucocorticoid Feedback in Alzheimer's Disease». *Biological Psychiatry* 59 (2): 155-61. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.017>.
- Erices, A., P. Conget, y J. J. Minguell. 2000. «Mesenchymal Progenitor Cells in Human Umbilical Cord Blood». *British Journal of Haematology* 109 (1): 235-42.
- Espejo, E. F. 1997. «Effects of Weekly or Daily Exposure to the Elevated Plus-Maze in Male Mice». *Behavioural Brain Research* 87 (2): 233-38.
- Evans, D. B., K. B. Rank, K. Bhattacharya, D. R. Thomsen, M. E. Gurney, y S. K. Sharma. 2000. «Tau Phosphorylation at Serine 396 and Serine 404 by Human Recombinant Tau Protein Kinase II Inhibits Tau's Ability to Promote Microtubule Assembly». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (32): 24977-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000808200>.
- Fan, Cun Gang, Feng Wu Tang, Qing Jun Zhang, Shi Hong Lu, Hai Ying Liu, Zong Mao Zhao, Bin Liu, Zhi Bo Han, y Zhong Chao Han. 2005. «Characterization and Neural Differentiation of Fetal Lung Mesenchymal Stem Cells». *Cell Transplantation* 14 (5): 311-21.
- Fan, Dawei, Yassar Alamri, Karen Liu, Michael MacAskill, Paul Harris, Margaret Brimble, John Dalrymple-Alford, y col. 2018. «Supplementation of Blackcurrant Anthocyanins Increased Cyclic Glycine-Proline in the Cerebrospinal Fluid of Parkinson Patients: Potential Treatment to Improve Insulin-Like Growth Factor-1 Function». *Nutrients* 10 (6). <https://doi.org/10.3390/nu10060714>.
- Farrer, L. A., L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch, y C. M. van Duijn. 1997. «Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease. A Meta-Analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium». *JAMA* 278 (16): 1349-56.
- Fedotova, Julia, Vagif Soultanov, Tamara Nikitina, Victor Roschin, Natalia Ordyan, y Lucian Hritcu. 2016. «Ropren® Treatment Reverses Anxiety-like Behavior and Monoamines Levels in Gonadectomized Rat Model of Alzheimer's Disease». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 83 (octubre): 1444-55. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.065>.
- Fernandez, Ana M., y Ignacio Torres-Alemán. 2012. «The Many Faces of Insulin-like Peptide Signalling in the Brain». *Nature Reviews. Neuroscience* 13 (4): 225-39. <https://doi.org/10.1038/nrn3209>.

- Ferreira, Sergio T., y William L. Klein. 2011. «The A $\beta$  Oligomer Hypothesis for Synapse Failure and Memory Loss in Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Learning and Memory* 96 (4): 529-43. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.08.003>.
- Ferri, Cleusa P., Martin Prince, Carol Brayne, Henry Brodaty, Laura Fratiglioni, Mary Ganguli, Kathleen Hall, y col. 2005. «Global Prevalence of Dementia: A Delphi Consensus Study». *Lancet (London, England)* 366 (9503): 2112-17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0).
- Firth, Sue M., y Robert C. Baxter. 2002. «Cellular Actions of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins». *Endocrine Reviews* 23 (6): 824-54. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0033>.
- Florian, Maria Carolina, y Hartmut Geiger. 2010. «Concise Review: Polarity in Stem Cells, Disease, and Aging». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (9): 1623-29. <https://doi.org/10.1002/stem.481>.
- Forner, Stefania, David Baglietto-Vargas, Alessandra C. Martini, Laura Trujillo-Estrada, y Frank M. LaFerla. 2017. «Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony». *Trends in Neurosciences* 40 (6): 347-57. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.002>.
- Fortuna, Juliana T. S., Matthias Gralle, Danielle Beckman, Fernanda S. Neves, Luan P. Diniz, Paula S. Frost, Fernanda Barros-Aragão, y col. 2017. «Brain Infusion of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers Induces Motor and Non-Motor Parkinson's Disease-like Symptoms in Mice». *Behavioural Brain Research* 333: 150-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.047>.
- Fox MA, y Sanes JR. 2007. «Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses.» 503(2):280-96 (julio). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Synaptotagmin+I+and+II+are+present+in+distinct+subsets+of+central+synapses>.
- Francis, P. T., A. M. Palmer, M. Snape, y G. K. Wilcock. 1999. «The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 66 (2): 137-47.
- Fratiglioni, L., A. Ahlbom, M. Viitanen, y B. Winblad. 1993. «Risk Factors for Late-Onset Alzheimer's Disease: A Population-Based, Case-Control Study». *Annals of Neurology* 33 (3): 258-66. <https://doi.org/10.1002/ana.410330306>.
- Freeman, Stefanie H., Ruth Kandel, Luis Cruz, Anete Rozkalne, Kathy Newell, Matthew P. Frosch, E. Tessa Hedley-Whyte, Joseph J. Locascio, Lewis A. Lipsitz, y Bradley T. Hyman. 2008. «Preservation of Neuronal Number despite Age-Related Cortical Brain Atrophy in Elderly Subjects without Alzheimer Disease». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 67 (12): 1205-12. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818fc72f>.
- Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan y K.S. Lalykina. 1970. «The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells». *Cell and Tissue Kinetics* 3 (4): 393-403.
- Frölich, L., D. Blum-Degen, H. G. Bernstein, S. Engelsberger, J. Humrich, S. Laufer, D. Muschner, y col. 1998. «Brain Insulin and Insulin Receptors in Aging and Sporadic Alzheimer's Disease». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 105 (4-5): 423-38. <https://doi.org/10.1007/s007020050068>.
- Gallagher, M., R. Burwell, y M. Burchinal. 1993. «Severity of Spatial Learning Impairment in Aging: Development of a Learning Index for Performance in the Morris Water Maze». *Behavioral Neuroscience* 107 (4): 618-26.
- Gao, Chong, Yueze Liu, Yuanhong Jiang, Jianming Ding, y Lin Li. 2014. «Geniposide Ameliorates Learning Memory Deficits, Reduces Tau Phosphorylation and Decreases Apoptosis via GSK3 $\beta$  Pathway in Streptozotocin-Induced Alzheimer Rat Model». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 24 (3): 261-69. <https://doi.org/10.1111/bpa.12116>.
- Gao, Xiang, Keun-Sik Kim, y Dexi Liu. 2007. «Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next». *The AAPS Journal* 9 (1): E92-104. <https://doi.org/10.1208/aapsj0901009>.
- Garcia, Mariana G., Juan Bayo, Marcela F. Bolontrade, Leonardo Sganga, Mariana Malvicini, Laura Alaniz, Jorge B. Aquino, y col. 2011. «Hepatocellular Carcinoma Cells and Their Fibrotic Microenvironment Modulate Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Migration in Vitro and in Vivo». *Molecular Pharmaceutics* 8 (5): 1538-48. <https://doi.org/10.1021/mp200137c>.

- Gastinel, L. N., M. Dardenne, J. M. Pleau, y J. F. Bach. 1984. «Studies on the Zinc Binding Site to the Serum Thymic Factor». *Biochimica Et Biophysica Acta* 797 (2): 147-55.
- Gatti, Stefano, Stefania Bruno, Maria Chiara Deregibus, Andrea Sordi, Vincenzo Cantaluppi, Ciro Tetta, y Giovanni Camussi. 2011. «Microvesicles Derived from Human Adult Mesenchymal Stem Cells Protect against Ischaemia-Reperfusion-Induced Acute and Chronic Kidney Injury». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26 (5): 1474-83. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr015>.
- Gawel, Kinga, Krzysztof Labuz, Ewa Gibula-Bruzda, Małgorzata Jenda, Marta Marszałek-Grabska, Joanna Filarowska, Jerzy Silberring, y Jolanta H. Kotlinska. 2016. «Cholinesterase Inhibitors, Donepezil and Rivastigmine, Attenuate Spatial Memory and Cognitive Flexibility Impairment Induced by Acute Ethanol in the Barnes Maze Task in Rats». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389 (10): 1059-71. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1269-8>.
- Genis, Laura, David Dávila, Silvia Fernandez, Andrea Pozo-Rodríguez, Ricardo Martínez-Murillo, y Ignacio Torres-Aleman. 2014. «Astrocytes Require Insulin-like Growth Factor I to Protect Neurons against Oxidative Injury». *F1000Research* 3: 28. <https://doi.org/10.12688/f1000research.3-28.v2>.
- Giacca, Mauro. 2007. «Virus-mediated gene transfer to induce therapeutic angiogenesis: Where do we stand?» *International Journal of Nanomedicine* 2 (4): 527-40.
- Glasgow, JN, M Everts, y DT Curiel. 2006. «Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy». *Cancer gene therapy* 13 (9): 830-44. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700928>.
- Glass, Christopher K., Kaoru Saito, Beate Winner, Maria Carolina Marchetto, y Fred H. Gage. 2010. «Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration». *Cell* 140 (6): 918-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>.
- Glennie, Sarah, Inês Soeiro, Peter J. Dyson, Eric W.-F. Lam, y Francesco Dazzi. 2005. «Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Induce Division Arrest Anergy of Activated T Cells». *Blood* 105 (7): 2821-27. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>.
- Glowinski, J., y L. L. Iversen. 1966. «Regional Studies of Catecholamines in the Rat Brain. I. The Disposition of [3H]Norepinephrine, [3H]Dopamine and [3H]Dopa in Various Regions of the Brain». *Journal of Neurochemistry* 13 (8): 655-69.
- Goedert, Michel, y Maria Grazia Spillantini. 2006. «A Century of Alzheimer's Disease». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5800): 777-81. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>.
- Goff, B. L., J. A. Roth, L. H. Arp, y G. S. Incefy. 1987. «Growth Hormone Treatment Stimulates Thymulin Production in Aged Dogs». *Clinical and Experimental Immunology* 68 (3): 580-87.
- Gómez-Isla, T., J. L. Price, D. W. McKeel, J. C. Morris, J. H. Growdon, y B. T. Hyman. 1996. «Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (14): 4491-4500.
- Gómez-Isla T., Spires T., De Calignon A. y Hyman BT. 2008. «Neuropathology of Alzheimer's Disease». *Handbook of Clinical Neurology* 89: 233-43. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)01222-5](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)01222-5).
- Gómez-Nicola, Diego, y Delphine Boche. 2015. «Post-Mortem Analysis of Neuroinflammatory Changes in Human Alzheimer's Disease». *Alzheimer's Research & Therapy* 7 (1): 42. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0126-1>.
- Gong, Yuesong, Lei Chang, Kirsten L. Viola, Pascale N. Lacor, Mary P. Lambert, Caleb E. Finch, Grant A. Krafft, y William L. Klein. 2003. «Alzheimer's Disease-Affected Brain: Presence of Oligomeric A Beta Ligands (ADDLs) Suggests a Molecular Basis for Reversible Memory Loss». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (18): 10417-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834302100>.
- Gossen, M., y H. Bujard. 1992. «Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12): 5547-51.
- Götz, Jürgen, y Lars M. Ittner. 2008. «Animal Models of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia». *Nature Reviews. Neuroscience* 9 (7): 532-44. <https://doi.org/10.1038/nrn2420>.

- Goya, R. G., G. M. Cónsole, O. M. Spinelli, M. H. Carino, F. Riccillo, y F. J. Corrons. 2003. «Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Lymphoid Organs Is Associated with a Delayed Increase in Circulating Deoxyribonucleic Acid». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 8 (2): 171-77.
- Goya, R. G., M. C. Gagnerault, M. C. De Moraes, W. Savino, y M. Dardenne. 1992. «In Vivo Effects of Growth Hormone on Thymus Function in Aging Mice». *Brain, Behavior, and Immunity* 6 (4): 341-54.
- Goya, Rodolfo G., Gloria M. Cónsole, Claudia B. Hereñú, Oscar A. Brown, y Omar J. Rimoldi. 2002. «Thymus and Aging: Potential of Gene Therapy for Restoration of Endocrine Thymic Function in Thymus-Deficient Animal Models». *Gerontology* 48 (5): 325-28. <https://doi.org/10.1159/000065258>.
- Goya, Rodolfo G., Paula C. Reggiani, Silvan M. Vesenbeckh, Jean M. Pléau, Yolanda E. Sosa, Gloria M. Cónsole, Rüdiger Schade, Peter Henklein, y Mireille Dardenne. 2007. «Thymulin Gene Therapy Prevents the Reduction in Circulating Gonadotropins Induced by Thymulin Deficiency in Mice». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293 (1): E182-187. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00085.2007>.
- Graham, F. L., y L. Prevec. 1992. «Adenovirus-Based Expression Vectors and Recombinant Vaccines». *Biotechnology (Reading, Mass.)* 20: 363-90.
- Gralle, Matthias, y Sérgio T. Ferreira. 2007. «Structure and Functions of the Human Amyloid Precursor Protein: The Whole Is More than the Sum of Its Parts». *Progress in Neurobiology* 82 (1): 11-32. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.001>.
- Grieb, Paweł. 2016. «Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: In Search of a Relevant Mechanism». *Molecular Neurobiology* 53 (3): 1741-52. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>.
- Grimm, Amandine, y Anne Eckert. 2017. «Brain Aging and Neurodegeneration: From a Mitochondrial Point of View». *Journal of Neurochemistry* 143 (4): 418-31. <https://doi.org/10.1111/jnc.14037>.
- Grimm, Stefanie, Annika Hoehn, Kelvin J. Davies, y Tilman Grune. 2011. «Protein Oxidative Modifications in the Ageing Brain: Consequence for the Onset of Neurodegenerative Disease». *Free Radical Research* 45 (1): 73-88. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.512040>.
- Grünblatt, Edna, Eleni Koutsilieri, Siegfried Hoyer, y Peter Riederer. 2006. «Gene Expression Alterations in Brain Areas of Intracerebroventricular Streptozotocin Treated Rat». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9 (3): 261-71.
- Grünblatt, Edna, Melita Salkovic-Petrisic, Jelena Osmanovic, Peter Riederer, y Siegfried Hoyer. 2007. «Brain Insulin System Dysfunction in Streptozotocin Intracerebroventricularly Treated Rats Generates Hyperphosphorylated Tau Protein». *Journal of Neurochemistry* 101 (3): 757-70. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04368.x>.
- Gsell, Wieland, Gerd Jungkunz, y Peter Riederer. 2004. «Functional Neurochemistry of Alzheimer's Disease». *Current Pharmaceutical Design* 10 (3): 265-93.
- Guo, Zhangyu, Yanxing Chen, Yan-Fang Mao, Tingting Zheng, Yasi Jiang, Yaping Yan, Xinzen Yin, y Baorong Zhang. 2017. «Long-Term Treatment with Intranasal Insulin Ameliorates Cognitive Impairment, Tau Hyperphosphorylation, and Microglial Activation in a Streptozotocin-Induced Alzheimer's Rat Model». *Scientific Reports* 7: 45971. <https://doi.org/10.1038/srep45971>.
- Gupta, Sandeep, Catherine Verfaillie, David Chmielewski, Stefan Kren, Keith Eidman, Jeffrey Connaire, Yves Heremans, y col. 2006. «Isolation and Characterization of Kidney-Derived Stem Cells». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17 (11): 3028-40. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006030275>.
- Gupta, Smriti, Kamalendra Yadav, Shrikant S. Mantri, Nitin K. Singhal, Subramaniam Ganesh, y Rajat Sandhir. 2018. «Evidence for Compromised Insulin Signaling and Neuronal Vulnerability in Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease». *Molecular Neurobiology* 55 (12): 8916-35. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0985-0>.
- Haj-ali, V., G. Mohaddes, y S. H. Babri. 2009. «Intracerebroventricular Insulin Improves Spatial Learning and Memory in Male Wistar Rats». *Behavioral Neuroscience* 123 (6): 1309-14. <https://doi.org/10.1037/a0017722>.
- Halliwell, Barry. 2006. «Oxidative Stress and Neurodegeneration: Where Are We Now?». *Journal of Neurochemistry* 97 (6): 1634-58. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>.

- Halmos, Tamás, y Ilona Suba. 2011. «[Role of the brain in the regulation of metabolism and energy expenditure: the central role of insulin, and insulin resistance of the brain]». *Orvosi Hetilap* 152 (3): 83-91. <https://doi.org/10.1556/OH.2011.28981>.
- Hansen, David V., Jesse E. Hanson, y Morgan Sheng. 2018. «Microglia in Alzheimer's Disease». *The Journal of Cell Biology* 217 (2): 459-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>.
- Haque, Nazmul, Mohammad Tariqur Rahman, Noor Hayaty Abu Kasim, y Aied Mohammed Alabsi. 2013. «Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy». *TheScientificWorldJournal* 2013: 632972. <https://doi.org/10.1155/2013/632972>.
- Hardy, John, y Dennis J. Selkoe. 2002. «The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5580): 353-56. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>.
- Hashemi-Firouzi, Nasrin, Alireza Komaki, Sara Soleimani Asl, y Siamak Shahidi. 2017. «The Effects of the 5-HT Receptor on Hippocampal Long-Term Potentiation and Apoptosis in a Rat Model of Alzheimer's Disease». *Brain Research Bulletin* 135 (octubre): 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.10.004>.
- Hass, Ralf, Cornelia Kasper, Stefanie Böhm, y Roland Jacobs. 2011. «Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC». *Cell Communication and Signaling: CCS* 9 (mayo): 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>.
- Havrankova, J., D. Schmechel, J. Roth, y M. Brownstein. 1978. «Identification of Insulin in Rat Brain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (11): 5737-41.
- Havrankova, JANA, JESSE Roth, y MICHAEL J. Brownstein. 1983. «Insulin Receptors in Brain». En *Advances in Metabolic Disorders*, editado por Andrew J. Szabo, 10:259-68. CNS Regulation of Carbohydrate Metabolism. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-027310-2.50014-1>.
- Hawkes, Cheryl, Jack H. Jhamandas, Kim H. Harris, Wen Fu, Richard G. MacDonald, y Satyabrata Kar. 2006. «Single Transmembrane Domain Insulin-like Growth Factor-II/Mannose-6-Phosphate Receptor Regulates Central Cholinergic Function by Activating a G-Protein-Sensitive, Protein Kinase C-Dependent Pathway». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (2): 585-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2730-05.2006>.
- Heide, Lars P. van der, Geert M. J. Ramakers, y Marten P. Smidt. 2006. «Insulin Signaling in the Central Nervous System: Learning to Survive». *Progress in Neurobiology* 79 (4): 205-21. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.003>.
- Hellweg, R., R. Nitsch, C. Hock, M. Jaksch, y S. Hoyer. 1992. «Nerve Growth Factor and Choline Acetyltransferase Activity Levels in the Rat Brain Following Experimental Impairment of Cerebral Glucose and Energy Metabolism». *Journal of Neuroscience Research* 31 (3): 479-86. <https://doi.org/10.1002/jnr.490310310>.
- Heneka, Michael T., Monica J. Carson, Joseph El Khoury, Gary E. Landreth, Frederic Brosseron, Douglas L. Feinstein, Andreas H. Jacobs, y col. 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).
- Henneberg, N., y S. Hoyer. 1995. «Desensitization of the Neuronal Insulin Receptor: A New Approach in the Etiopathogenesis of Late-Onset Sporadic Dementia of the Alzheimer Type (SDAT)?» *Archives of Gerontology and Geriatrics* 21 (1): 63-74.
- Henriques-Coelho, Tiago, Sílvia Marta Oliveira, Rute S. Moura, Roberto Roncon-Albuquerque, Ana Luísa Neves, Mário Santos, Cristina Nogueira-Silva, y col. 2008. «Thymulin Inhibits Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension Modulating Interleukin-6 Expression and Suppressing P38 Pathway». *Endocrinology* 149 (9): 4367-73. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0018>.
- Hereñú, C. B., C. Cristina, O. J. Rimoldi, D. Becú-Villalobos, V. Cambiaggi, E. L. Portiansky, y R. G. Goya. 2007. «Restorative Effect of Insulin-like Growth Factor-I Gene Therapy in the Hypothalamus of Senile Rats with Dopaminergic Dysfunction». *Gene Therapy* 14 (3): 237-45. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302870>.

- Hereñú, C. B., W. E. Sonntag, G. R. Morel, E. L. Portiansky, y R. G. Goya. 2009. «The Ependymal Route for Insulin-like Growth Factor-1 Gene Therapy in the Brain». *Neuroscience* 163 (1): 442-47. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.024>.
- Hidaka, C., E. Milano, P. L. Leopold, J. M. Bergelson, N. R. Hackett, R. W. Finberg, T. J. Wickham, I. Kovesdi, P. Roelvink, y R. G. Crystal. 1999. «CAR-Dependent and CAR-Independent Pathways of Adenovirus Vector-Mediated Gene Transfer and Expression in Human Fibroblasts». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (4): 579-87. <https://doi.org/10.1172/JCI5309>.
- Hippius, Hanns, y Gabriele Neundörfer. 2003. «The discovery of Alzheimer's disease». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 5 (1): 101-8.
- Hitt M, Bett A, Prevec L, y Graham FL. 1998. *Construction and propagation of human adenovirus vectors*. Celis J, editor. Cell biology: A laboratory handbook. Academic Press; New York.
- Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, A. Keating, y International Society for Cellular Therapy. 2005. «Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement». *Cyotherapy* 7 (5): 393-95. <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>.
- Hosseinzadeh, Soheila, Maryam Zahmatkesh, Mansour Heidari, Gholam-Reza Hassanzadeh, Morteza Karimian, Abdolfattah Sarrafnejad, y Mohammad-Reza Zarrindast. 2015. «Hippocampal DHCR24 down Regulation in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Cognitive Decline». *Neuroscience Letters* 587 (febrero): 107-12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.12.039>.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, y B. M. Spiegelman. 1993. «Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha: Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance». *Science (New York, N.Y.)* 259 (5091): 87-91.
- Hotamisligil, Gökhan S. 2006. «Inflammation and Metabolic Disorders». *Nature* 444 (7121): 860-67. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.
- Howard, Vyvyan, y Matthew Reed. 2004. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Garland Science.
- Hoyer, S. 1998. «Is Sporadic Alzheimer Disease the Brain Type of Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus? A Challenging Hypothesis». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 105 (4-5): 415-22. <https://doi.org/10.1007/s007020050067>.
- Hoyer, S. 2002. «The Brain Insulin Signal Transduction System and Sporadic (Type II) Alzheimer Disease: An Update». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 109 (3): 341-60. <https://doi.org/10.1007/s007020200028>.
- Hoyer, S. 2004. «Glucose Metabolism and Insulin Receptor Signal Transduction in Alzheimer Disease». *European Journal of Pharmacology* 490 (1-3): 115-25. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.049>.
- Hoyer, S. y Heinrich Lannert. 2008. «Long-Term Effects of Corticosterone on Behavior, Oxidative and Energy Metabolism of Parietotemporal Cerebral Cortex and Hippocampus of Rats: Comparison to Intracerebroventricular Streptozotocin». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 115 (9): 1241-49. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0079-7>.
- Hsieh, Helen, Jannic Boehm, Chihiro Sato, Takeshi Iwatsubo, Taisuke Tomita, Sangram Sisodia, y Roberto Malinow. 2006. «AMPA-R Removal Underlies A $\beta$ -induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss». *Neuron* 52 (5): 831-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.035>.
- Hwang, Hye-Jung, Mi-Jin Kwon, y Taek-Jeong Nam. 2007. «Chemoprotective Effect of Insulin-like Growth Factor I against Acetaminophen-Induced Cell Death in Chang Liver Cells via ERK1/2 Activation». *Toxicology* 230 (1): 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.001>.
- Hyman, B. T., G. W. Van Hoesen, A. R. Damasio, y C. L. Barnes. 1984. «Alzheimer's Disease: Cell-Specific Pathology Isolates the Hippocampal Formation». *Science (New York, N.Y.)* 225 (4667): 1168-70.
- In 't Anker, Piaternella S., Sicco A. Scherjon, Carin Kleijburg-van der Keur, Godelieve M. J. S. de Groot-Swings, Frans H. J. Claas, Willem E. Fibbe, y Humphrey H. H. Kanhai. 2004. «Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22 (7): 1338-45. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>.

- Irvine, G. Brent, Omar M. El-Agnaf, Ganesh M. Shankar, y Dominic M. Walsh. 2008. «Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 14 (7-8): 451-64. <https://doi.org/10.2119/2007-00100.Irvine>.
- Ishrat, Tauheed, Kehkashan Parveen, Mohd Moshahid Khan, Gulrana Khuwaja, M. Badruzzaman Khan, Seema Yousuf, Ajmal Ahmad, Pallavi Shrivastav, y Fakhrul Islam. 2009. «Selenium Prevents Cognitive Decline and Oxidative Damage in Rat Model of Streptozotocin-Induced Experimental Dementia of Alzheimer's Type». *Brain Research* 1281 (julio): 117-27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.04.010>.
- Isik, Ahmet Turan, Turgay Celik, Ali Ugur Ural, Murat Tosun, Gokhan Ulusoy, y Birsen Elibol. 2016. «Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Streptozotocin-Induced Neurodegeneration in Rats». *Neurological Research* 38 (4): 364-72. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1139292>.
- Islam, Mohammad Naimul, Shonit R. Das, Memet T. Emin, Michelle Wei, Li Sun, Kristin Westphalen, David J. Rowlands, Sadiqa K. Quadri, Sunita Bhattacharya, y Jahar Bhattacharya. 2012. «Mitochondrial Transfer from Bone-Marrow-Derived Stromal Cells to Pulmonary Alveoli Protects against Acute Lung Injury». *Nature Medicine* 18 (5): 759-65. <https://doi.org/10.1038/nm.2736>.
- Ittner, Lars M., Yazi D. Ke, Fabien Delerue, Mian Bi, Amadeus Gladbach, Janet van Eersel, Heidrun Wölfig, y col. 2010. «Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid-Beta Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models». *Cell* 142 (3): 387-97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>.
- Iwata, Tsutomu, Genevieve S. Incefy, Susanna Cunningham-Rundles, Charlotte Cunningham-Rundles, Elizabeth Smithwick, Nancy Geller, Richard O'Reilly, y Robert A. Good. 1981. «Circulating Thymic Hormone Activity in Patients with Primary and Secondary Immunodeficiency Diseases». *The American Journal of Medicine* 71 (3): 385-94. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90164-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90164-9).
- Jacobsen, J. Steven, Chi-Cheng Wu, Jeffrey M. Redwine, Thomas A. Comery, Robert Arias, Mark Bowlby, Robert Martone, y col. 2006. «Early-Onset Behavioral and Synaptic Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (13): 5161-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600948103>.
- Janowski, Miroslaw, Daniel-Christoph Wagner, y Johannes Boltze. 2015. «Stem Cell-Based Tissue Replacement After Stroke: Factual Necessity or Notorious Fiction?». *Stroke* 46 (8): 2354-63. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007803>.
- Javed, Hayate, Mohd Moshahid Khan, Andleeb Khan, Kumar Vaibhav, Ajmal Ahmad, Gulrana Khuwaja, Md Ejaz Ahmed, y col. 2011. «S-Allyl Cysteine Attenuates Oxidative Stress Associated Cognitive Impairment and Neurodegeneration in Mouse Model of Streptozotocin-Induced Experimental Dementia of Alzheimer's Type». *Brain Research* 1389 (mayo): 133-42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.072>.
- Jiang, Teng, Jin-Tai Yu, y Lan Tan. 2012. «Novel Disease-Modifying Therapies for Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 31 (3): 475-92. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120640>.
- Johansson, Per, Daniel Åberg, Jan-Ove Johansson, Niklas Mattsson, Oskar Hansson, Bo Ahrén, Jörgen Isgaard, y col. 2013. «Serum but Not Cerebrospinal Fluid Levels of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-Binding Protein-3 (IGFBP-3) Are Increased in Alzheimer's Disease». *Psychoneuroendocrinology* 38 (9): 1729-37. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.006>.
- Jones, D. T., M. M. Machulda, P. Vemuri, E. M. McDade, G. Zeng, M. L. Senjem, J. L. Gunter, y col. 2011. «Age-Related Changes in the Default Mode Network Are More Advanced in Alzheimer Disease». *Neurology* 77 (16): 1524-31. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318233b33d>.
- Kamat, Pradip Kumar. 2015. «Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism». *Neural Regeneration Research* 10 (7): 1050-52. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.160076>.
- Kameoka, Sei, Joshua Babiarz, Kyle Kolaja, y Eric Chiao. 2014. «A High-Throughput Screen for Teratogens Using Human Pluripotent Stem Cells». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 137 (1): 76-90. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft239>.
- Kanaan, Salim A, Bared Safieh-Garabedian, Mark Karam, Hala Khansa, Suhayl J Jabbur, Abdo R Jurus, y Nayef E Saade. 2002. «Thymulin Reduces the Hyperalgesia and Cytokine Upregulation Induced by Cutaneous

- Leishmaniasis in Mice». *Brain, Behavior, and Immunity* 16 (4): 450-60. <https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0631>.
- Kang, Sung Keun, Il Seob Shin, Myung Soon Ko, Jung Youn Jo, y Jeong Chan Ra. 2012. «Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy». *Stem Cells International* 2012: 342968. <https://doi.org/10.1155/2012/342968>.
- Karahuseyinoglu, Sercin, Ozgur Cinar, Emine Kilic, Fadil Kara, Guvem Gumus Akay, Duygu Ozel Demiralp, Ajlan Tukun, Duygu Uckan, y Alp Can. 2007. «Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and in Vitro Surveys». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (2): 319-31. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286>.
- Karussis, Dimitrios, Ibrahim Kassis, Basan Gowda S. Kurkalli, y Shimon Slavin. 2008. «Immunomodulation and Neuroprotection with Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells (MSCs): A Proposed Treatment for Multiple Sclerosis and Other Neuroimmunological/Neurodegenerative Diseases». *Journal of the Neurological Sciences* 265 (1-2): 131-35. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.05.005>.
- Kaur, Upinder, Priyanjalee Banerjee, Aritri Bir, Maitrayee Sinha, Atanu Biswas, y Sasanka Chakrabarti. 2015. «Reactive Oxygen Species, Redox Signaling and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The NF-KB Connection». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15 (5): 446-57.
- Kazanis, Ilias, Margaret Giannakopoulou, Helen Philippidis, y Fotini Stylianopoulou. 2004. «Alterations in IGF-I, BDNF and NT-3 Levels Following Experimental Brain Trauma and the Effect of IGF-I Administration». *Experimental Neurology* 186 (2): 221-34. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.12.004>.
- Khandelwal, Preeti J., Alexander M. Herman, y Charbel E.-H. Moussa. 2011. «Inflammation in the Early Stages of Neurodegenerative Pathology». *Journal of Neuroimmunology* 238 (1-2): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.07.002>.
- Kheradmand, Elham, Akbar Hajizadeh Moghaddam, y Mahboobeh Zare. 2018. «Neuroprotective Effect of Hesperetin and Nano-Hesperetin on Recognition Memory Impairment and the Elevated Oxygen Stress in Rat Model of Alzheimer's Disease». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 97 (enero): 1096-1101. <https://doi.org/10.1016/j.biopharm.2017.11.047>.
- Kim B., Cheng H.L., Margolis B. y Feldman E.L. 1998. «Insulin Receptor Substrate 2 and Shc Play Different Roles in Insulin-like Growth Factor I Signaling». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (51): 34543-50.
- Kim, Dajeong, Jangbeen Kyung, Dongsun Park, Ehn-Kyoung Choi, Kwang Sei Kim, Kyungha Shin, Hangyoung Lee, y col. 2015. «Health Span-Extending Activity of Human Amniotic Membrane- and Adipose Tissue-Derived Stem Cells in F344 Rats». *Stem Cells Translational Medicine* 4 (10): 1144-54. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0011>.
- Kim, Tae-Kyung, Hye-Eun Han, Hannah Kim, Jung-Eun Lee, Daehan Choi, Woo Jin Park, y Pyung-Lim Han. 2012. «Expression of the Plant Viral Protease N1a in the Brain of a Mouse Model of Alzheimer's Disease Mitigates A $\beta$  Pathology and Improves Cognitive Function». *Experimental & Molecular Medicine* 44 (12): 740-48. <https://doi.org/10.3858/EMM.2012.44.12.082>.
- Kimura, E., Y. Maeda, T. Arima, Y. Nishida, S. Yamashita, A. Hara, E. Uyama, S. Mita, y M. Uchino. 2001. «Efficient Repetitive Gene Delivery to Skeletal Muscle Using Recombinant Adenovirus Vector Containing the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor CDNA». *Gene Therapy* 8 (1): 20-27. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301359>.
- Kirkpatrick, Brianne, Laura Hercher, Flavia Facio, Jill Fonda, Susan Hahn, Julie Sapp, Heather Zierhut, y Stem Cell Research Task Force on behalf of the Public Policy Committee. 2013. «Stem Cell Research and Therapy: The Position of the National Society of Genetic Counselors». *Journal of Genetic Counseling* 22 (4): 407-10. <https://doi.org/10.1007/s10897-013-9572-8>.
- Klein, William L. 2006. «Synaptic Targeting by A Beta Oligomers (ADDLS) as a Basis for Memory Loss in Early Alzheimer's Disease». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 2 (1): 43-55. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2005.11.003>.
- Klementiev, B., T. Novikova, V. Novitskaya, P. S. Walmod, O. Dmytryeva, B. Pakkenberg, V. Berezin, y E. Bock. 2007. «A Neural Cell Adhesion Molecule-Derived Peptide Reduces Neuropathological Signs and Cognitive Impairment Induced by Abeta25-35». *Neuroscience* 145 (1): 209-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.060>.

- Knezovic, A., A. Loncar, J. Homolak, U. Smailovic, J. Osmanovic Barilar, L. Ganoci, N. Bozina, P. Riederer, y Melita Salkovic-Petrisic. 2017. «Rat Brain Glucose Transporter-2, Insulin Receptor and Glial Expression Are Acute Targets of Intracerebroventricular Streptozotocin: Risk Factors for Sporadic Alzheimer's Disease?» *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 124 (6): 695-708. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1727-6>.
- Knezovic, Ana, Jelena Osmanovic-Barilar, Marija Curlin, Patrick R. Hof, Goran Simic, Peter Riederer, y Melita Salkovic-Petrisic. 2015. «Staging of Cognitive Deficits and Neuropathological and Ultrastructural Changes in Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 122 (4): 577-92. <https://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>.
- Koffie, Robert M., Melanie Meyer-Luehmann, Tadafumi Hashimoto, Kenneth W. Adams, Matthew L. Mielke, Monica Garcia-Alloza, Kristina D. Micheva, y col. 2009. «Oligomeric Amyloid  $\beta$  Associates with Postsynaptic Densities and Correlates with Excitatory Synapse Loss near Senile Plaques». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (10): 4012-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811698106>.
- Kolf, Catherine M., Elizabeth Cho, y Rocky S. Tuan. 2007. «Mesenchymal Stromal Cells. Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells: Regulation of Niche, Self-Renewal and Differentiation». *Arthritis Research & Therapy* 9 (1): 204. <https://doi.org/10.1186/ar2116>.
- Kooijman, Ron, Sophie Sarre, Yvette Michotte, y Jacques De Keyser. 2009. «Insulin-like Growth Factor I: A Potential Neuroprotective Compound for the Treatment of Acute Ischemic Stroke?» *Stroke* 40 (4): e83-88. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.528356>.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, y D. G. Phinney. 1999. «Marrow Stromal Cells Migrate throughout Forebrain and Cerebellum, and They Differentiate into Astrocytes after Injection into Neonatal Mouse Brains». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (19): 10711-16.
- Kovacs, Peter, y Andras Hajnal. 2009. «In vivo electrophysiological effects of insulin in the rat brain». *Neuropeptides* 43 (4): 283-93. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2009.05.006>.
- Krafft, Grant A., y William L. Klein. 2010. «ADDLs and the Signaling Web That Leads to Alzheimer's Disease». *Neuropharmacology* 59 (4-5): 230-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.07.012>.
- Krampera, Mauro, Silvia Marconi, Annalisa Pasini, Mirco Galiè, Gino Rigotti, Federico Mosna, Martina Tinelli, y col. 2007. «Induction of Neural-like Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Fat, Spleen and Thymus». *Bone* 40 (2): 382-90. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.006>.
- Kraska, Audrey, Mathieu D. Santin, Olène Dorieux, Nelly Joseph-Mathurin, Emmanuel Bourrin, Fanny Petit, Caroline Jan, y col. 2012. «In Vivo Cross-Sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin». *PLoS One* 7 (9): e46196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046196>.
- Krasnykh, V. N., J. T. Douglas, y V. W. van Beusechem. 2000. «Genetic Targeting of Adenoviral Vectors». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 1 (5 Pt 1): 391-405. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0062>.
- Kroner, Zina. 2009. «The Relationship between Alzheimer's Disease and Diabetes: Type 3 Diabetes?» *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic* 14 (4): 373-79.
- Kshitiz, null, JinSeok Park, Peter Kim, Wilda Helen, Adam J. Engler, Andre Levchenko, y Deok-Ho Kim. 2012. «Control of Stem Cell Fate and Function by Engineering Physical Microenvironments». *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 4 (9): 1008-18.
- Kumar, Rohit, Amteshwar Singh Jaggi, y Nirmal Singh. 2010. «Effects of Erythropoietin on Memory Deficits and Brain Oxidative Stress in the Mouse Models of Dementia». *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 14 (5): 345-52. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2010.14.5.345>.
- Kurihara, Shigekazu, y FumiHIKO Hakuno. s. f. «Signal Transduction Pathways Leading to the Induction of Cell Growth and Differentiation of Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: The Roles of MAP Kinase Pathway and PI 3-Kinase Pathway», 13.
- Kurozumi, Kazuhiko, Kiminori Nakamura, Takashi Tamiya, Yutaka Kawano, Keiji Ishii, Masayoshi Kobune, Sachie Hirai, y col. 2005. «Mesenchymal Stem Cells That Produce Neurotrophic Factors Reduce

- Ischemic Damage in the Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 11 (1): 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.09.020>.
- Lacor, Pascale N., Maria C. Buniel, Lei Chang, Sara J. Fernandez, Yuesong Gong, Kirsten L. Viola, Mary P. Lambert, y col. 2004. «Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Beta Oligomers». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (45): 10191-200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3432-04.2004>.
- Lacor, Pascale N., Maria C. Buniel, Paul W. Furlow, Antonio Sanz Clemente, Pauline T. Velasco, Margaret Wood, Kirsten L. Viola, y William L. Klein. 2007. «Abeta Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (4): 796-807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007>.
- Lai, Ruenn Chai, Tian Sheng Chen, y Sai Kiang Lim. 2011. «Mesenchymal Stem Cell Exosome: A Novel Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease». *Regenerative Medicine* 6 (4): 481-92. <https://doi.org/10.2217/rme.11.35>.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, y col. 1998. «Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from Abeta1-42 Are Potent Central Nervous System Neurotoxins». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6448-53.
- Laron, Z. 2001. «Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone». *Molecular Pathology* 54 (5): 311-16.
- Laursen, S. E., y J. K. Belknap. 1986. «Intracerebroventricular Injections in Mice. Some Methodological Refinements». *Journal of Pharmacological Methods* 16 (4): 355-57.
- Lazarov, Orly, y Robert A. Marr. 2010. «Neurogenesis and Alzheimer's disease: At the crossroads». *Experimental Neurology*, Beta-amyloid and tau protein abnormalities in Alzheimer's disease, 223 (2): 267-81. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.009>.
- Le Blanc, K., y O. Ringdén. 2007. «Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells and Clinical Experience». *Journal of Internal Medicine* 262 (5): 509-25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x>.
- Le Blanc, Katarina, y Dimitrios Mougiaikakos. 2012. «Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and the Innate Immune System». *Nature Reviews. Immunology* 12 (5): 383-96. <https://doi.org/10.1038/nri3209>.
- Le Blanc, Katarina, Håkan Samuelsson, Lena Lönnies, Mikael Sundin, y Olle Ringdén. 2007. «Generation of Immunosuppressive Mesenchymal Stem Cells in Allogeneic Human Serum». *Transplantation* 84 (8): 1055-59. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000285088.44901.ea>.
- Lee, Hyun Ju, Jong Kil Lee, Hyun Lee, Ji-woong Shin, Janet E. Carter, Toshiro Sakamoto, Hee Kyung Jin, y Jaesung Bae. 2010. «The Therapeutic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Alzheimer's Disease». *Neuroscience Letters* 481 (1): 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.045>.
- Lee, Ryang Hwa, Andrey A. Pulin, Min Jeong Seo, Daniel J. Kota, Joni Ylostalo, Benjamin L. Larson, Laura Semprun-Prieto, Patrice Delafontaine, y Darwin J. Prockop. 2009. «Intravenous HMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice Because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-Inflammatory Protein TSG-6». *Cell Stem Cell* 5 (1): 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>.
- Lentz, Thomas B., Steven J. Gray, y R. Jude Samulski. 2012. «Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System». *Neurobiology of Disease* 48 (2): 179-88. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.014>.
- Lenzen, S. 2008. «The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin-Induced Diabetes». *Diabetologia* 51 (2): 216-26. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>.
- LeRoith, D., H. Werner, D. Beitner-Johnson, y C. T. Roberts. 1995. «Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-like Growth Factor I Receptor». *Endocrine Reviews* 16 (2): 143-63. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-2-143>.
- Lesné, Sylvain, Ming Teng Koh, Linda Kotilinek, Rakez Kayed, Charles G. Glabe, Austin Yang, Michela Gallagher, y Karen H. Ashe. 2006. «A Specific Amyloid-Beta Protein Assembly in the Brain Impairs Memory». *Nature* 440 (7082): 352-57. <https://doi.org/10.1038/nature04533>.

- Lester-Coll, Nataniel, Enrique J. Rivera, Stephanie J. Soscia, Kathryn Doiron, Jack R. Wands, y Suzanne M. de la Monte. 2006. «Intracerebral Streptozotocin Model of Type 3 Diabetes: Relevance to Sporadic Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9 (1): 13-33.
- Li, Ge, Elaine R. Peskind, Steven P. Millard, Peter Chi, Izabela Sokal, Chang-En Yu, Lynn M. Bekris, Murray A. Raskind, Douglas R. Galasko, y Thomas J. Montine. 2009. «Cerebrospinal Fluid Concentration of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cognitive Function in Non-Demented Subjects». *PLoS One* 4 (5): e5424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005424>.
- Lichtenwalner, R. J., M. E. Forbes, S. A. Bennett, C. D. Lynch, W. E. Sonntag, y D. R. Riddle. 2001. «Intracerebroventricular Infusion of Insulin-like Growth Factor-I Ameliorates the Age-Related Decline in Hippocampal Neurogenesis». *Neuroscience* 107 (4): 603-13.
- Lin, Weiping, Liangliang Xu, Stefan Zwingenberger, Emmanuel Gibon, Stuart B. Goodman, y Gang Li. 2017. «Mesenchymal Stem Cells Homing to Improve Bone Healing». *Journal of Orthopaedic Translation* 9 (abril): 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.03.002>.
- Lindvall, Olle, y Zaal Kokaia. 2010. «Stem Cells in Human Neurodegenerative Disorders--Time for Clinical Translation?» *The Journal of Clinical Investigation* 120 (1): 29-40. <https://doi.org/10.1172/JCI40543>.
- Liste, I., E. García-García, C. Bueno, y A. Martínez-Serrano. 2007. «Bcl-XL Modulates the Differentiation of Immortalized Human Neural Stem Cells». *Cell Death and Differentiation* 14 (11): 1880-92. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402205>.
- Loessner, A., A. Alavi, K. U. Lewandrowski, D. Mozley, E. Souder, y R. E. Gur. 1995. «Regional Cerebral Function Determined by FDG-PET in Healthy Volunteers: Normal Patterns and Changes with Age». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 36 (7): 1141-49.
- Lourenco, Mychael V., Julia R. Clarke, Rudimar L. Frozza, Theresa R. Bomfim, Letícia Forny-Germano, André F. Batista, Luciana B. Sathler, y col. 2013. «TNF- $\alpha$  Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys». *Cell Metabolism* 18 (6): 831-43. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.002>.
- Louzada, Paulo Roberto, Andréa C. Paula Lima, Dayde L. Mendonça-Silva, François Noël, Fernando G. De Mello, y Sérgio T. Ferreira. 2004. «Taurine Prevents the Neurotoxicity of Beta-Amyloid and Glutamate Receptor Agonists: Activation of GABA Receptors and Possible Implications for Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (3): 511-18. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0739com>.
- Lucin, Kurt M., y Tony Wyss-Coray. 2009. «Immune Activation in Brain Aging and Neurodegeneration: Too Much or Too Little?» *Neuron* 64 (1): 110-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.039>.
- Lunn, J. Simon, Stacey A. Sakowski, Junguk Hur, y Eva L. Feldman. 2011. «Stem Cell Technology for Neurodegenerative Diseases». *Annals of Neurology* 70 (3): 353-61. <https://doi.org/10.1002/ana.22487>.
- Lunn, J. Simon, Stacey A. Sakowski, Lisa M. McGinley, Crystal Pacut, Thomas G. Hazel, Karl Johe, y Eva L. Feldman. 2015. «Autocrine Production of IGF-I Increases Stem Cell-Mediated Neuroprotection». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33 (5): 1480-89. <https://doi.org/10.1002/stem.1933>.
- Luo, Xiao-Guang, Jian-Qing Ding, y Sheng-Di Chen. 2010. «Microglia in the Aging Brain: Relevance to Neurodegeneration». *Molecular Neurodegeneration* 5 (marzo): 12. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-12>.
- Madadi, Golnaz, Prasad S. Dalvi, y Denise D. Belsham. 2008. «Regulation of Brain Insulin mRNA by Glucose and Glucagon-like Peptide 1». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376 (4): 694-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.054>.
- Majkutewicz, Irena, Ewelina Kurowska, Magdalena Podlacha, Dorota Myślińska, Beata Grembecka, Jan Ruciński, Karolina Plucińska, Grażyna Jerzemowska, y Danuta Wrona. 2016. «Dimethyl Fumarate Attenuates Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Spatial Memory Impairment and Hippocampal Neurodegeneration in Rats». *Behavioural Brain Research* 308: 24-37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.04.012>.

- Majore, Ingrida, Pierre Moretti, Frank Stahl, Ralf Hass, y Cornelia Kasper. 2011. «Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord». *Stem Cell Reviews* 7 (1): 17-31. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9165-y>.
- Mansilla, Eduardo, Gustavo Roque, Yolanda E. Sosa, Adrian Tarditti, y Rodolfo G. Goya. 2016. «A Rat Treated with Mesenchymal Stem Cells Lives to 44 Months of Age». *Rejuvenation Research* 19 (4): 318-21. <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1777>.
- Marcus, Akiva J., Thomas M. Coyne, Judah Rauch, Dale Woodbury, y Ira B. Black. 2008. «Isolation, Characterization, and Differentiation of Stem Cells Derived from the Rat Amniotic Membrane». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 76 (2): 130-44. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00194.x>.
- Markowska, A. L., M. Mooney, y W. E. Sonntag. 1998. «Insulin-like Growth Factor-1 Ameliorates Age-Related Behavioral Deficits». *Neuroscience* 87 (3): 559-69.
- Marks, J. L., D. Porte, y D. G. Baskin. 1991. «Localization of Type I Insulin-like Growth Factor Receptor Messenger RNA in the Adult Rat Brain by in Situ Hybridization». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 5 (8): 1158-68. <https://doi.org/10.1210/mend-5-8-1158>.
- Martínez-Morales, P. L., A. Revilla, I. Ocaña, C. González, P. Sainz, D. McGuire, y I. Liste. 2013. «Progress in Stem Cell Therapy for Major Human Neurological Disorders». *Stem Cell Reviews* 9 (5): 685-99. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9443-6>.
- Mattson, Mark P. 2012. «Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease». *Cell Metabolism* 16 (6): 706-22. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.012>.
- Mayer, G., R. Nitsch, y S. Hoyer. 1990. «Effects of Changes in Peripheral and Cerebral Glucose Metabolism on Locomotor Activity, Learning and Memory in Adult Male Rats». *Brain Research* 532 (1-2): 95-100.
- McGeer, Patrick L., y Edith G. McGeer. 2004. «Inflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease». *Parkinsonism & Related Disorders* 10 Suppl 1 (mayo): S3-7. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.01.005>.
- McNay, Ewan C., Cecilia T. Ong, Rory J. McCrimmon, James Cresswell, Jonathan S. Bogan, y Robert S. Sherwin. 2010. «Hippocampal Memory Processes Are Modulated by Insulin and High-Fat-Induced Insulin Resistance». *Neurobiology of Learning and Memory* 93 (4): 546-53. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.02.002>.
- McNay, Ewan C., y Andrew K. Recknagel. 2011. «Brain Insulin Signaling: A Key Component of Cognitive Processes and a Potential Basis for Cognitive Impairment in Type 2 Diabetes». *Neurobiology of Learning and Memory* 96 (3): 432-42. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.08.005>.
- Medeiros, Rodrigo, y Frank M. LaFerla. 2013. «Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony». *Experimental Neurology* 239 (enero): 133-38. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.007>.
- Mehla, Jogender, Monika Pahuja, y Yogendra Kumar Gupta. 2013. «Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Disease: Selection of Appropriate Dose». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 33 (1): 17-21. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120958>.
- Meirelles, Lindolfo da Silva, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, y Arnold I. Caplan. 2009. «Mechanisms Involved in the Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (5-6): 419-27. <https://doi.org/10.1016/j.cytofr.2009.10.002>.
- Mesentier-Louro, Louise A., Juliana Coronel, Camila Zaverucha-do-Valle, Andre Mencalha, Bruno D. Paredes, Eliana Abdelhay, Rosalia Mendez-Otero, y Marcelo F. Santiago. 2012. «Cell Therapy Modulates Expression of Tax1-Binding Protein 1 and Synaptotagmin IV in a Model of Optic Nerve Lesion». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (8): 4720-29. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8198>.
- Miller, B. H., y A. C. Gore. 2001. «Alterations in Hypothalamic Insulin-like Growth Factor-I and Its Associations with Gonadotropin Releasing Hormone Neurones during Reproductive Development and Ageing». *Journal of Neuroendocrinology* 13 (8): 728-36.
- Minguell, J. J., A. Erices, y P. Conget. 2001. «Mesenchymal Stem Cells». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 226 (6): 507-20.

- Mochizuki, A., J. W. Peterson, E. J. Mufson, y B. D. Trapp. 1996. «Amyloid Load and Neural Elements in Alzheimer's Disease and Nondemented Individuals with High Amyloid Plaque Density». *Experimental Neurology* 142 (1): 89-102. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0181>.
- Mohammadi, Alireza, Ali Maleki-Jamshid, Peiman Brouki Milan, Kaveh Ebrahimzadeh, Faezeh Faghihi, y Mohammad Taghi Joghataei. 2018. «Intrahippocampal Transplantation of Undifferentiated Human Chorionic-Derived Mesenchymal Stem Cells Does Not Improve Learning and Memory in the Rat Model of Sporadic Alzheimer Disease». *Current Stem Cell Research & Therapy*, julio. <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180723111249>.
- Monczor, Myriam. Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem. – Central Nervous System Agents*, 2005.
- Monte, Suzanne M. de la. 2012. «Contributions of Brain Insulin Resistance and Deficiency in Amyloid-Related Neurodegeneration in Alzheimer's Disease». *Drugs* 72 (1): 49-66. <https://doi.org/10.2165/11597760-00000000-00000>.
- Monte, Suzanne M. de la, Ming Tong, Nataniel Lester-Coll, Michael Plater, y Jack R. Wands. 2006. «Therapeutic Rescue of Neurodegeneration in Experimental Type 3 Diabetes: Relevance to Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 10 (1): 89-109.
- Montgomery, D. L. 1994. «Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease». *Veterinary Pathology* 31 (2): 145-67. <https://doi.org/10.1177/030098589403100201>.
- Moolman, Donna L., Ottavio V. Vitolo, Jean-Paul G. Vonsattel, y Michael L. Shelanski. 2004. «Dendrite and Dendritic Spine Alterations in Alzheimer Models». *Journal of Neurocytology* 33 (3): 377-87. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000044197.83514.64>.
- Moore, Amy H., y M. K. O'Banion. 2002. «Neuroinflammation and Anti-Inflammatory Therapy for Alzheimer's Disease». *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (12): 1627-56.
- Moraes, Louise, Andreia Vasconcelos-dos-Santos, Fernando Cleber Santana, Mariana Araya Godoy, Paulo Henrique Rosado-de-Castro, null Jasmin, Ricardo Luiz Azevedo-Pereira, y col. 2012. «Neuroprotective Effects and Magnetic Resonance Imaging of Mesenchymal Stem Cells Labeled with SPION in a Rat Model of Huntington's Disease». *Stem Cell Research* 9 (2): 143-55. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.05.005>.
- Morel, G. R., T. Andersen, J. Pardo, G. O. Zuccolilli, V. L. Cambiaggi, C. B. Hereñú, y R. G. Goya. 2015. «Cognitive Impairment and Morphological Changes in the Dorsal Hippocampus of Very Old Female Rats». *Neuroscience* 303 (septiembre): 189-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.050>.
- Morel, Gustavo R., Oscar A. Brown, Paula C. Reggiani, Claudia B. Hereñú, Enrique L. Portiansky, Gustavo O. Zuccolilli, Jean M. Pléau, Mireille Dardenne, y Rodolfo G. Goya. 2006. «Peripheral and Mesencephalic Transfer of a Synthetic Gene for the Thymic Peptide Thymulin». *Brain Research Bulletin* 69 (6): 647-51. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.03.015>.
- Morterá, Priscilla, y Suzana Herculano-Houzel. 2012. «Age-Related Neuronal Loss in the Rat Brain Starts at the End of Adolescence». *Frontiers in Neuroanatomy* 6: 45. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00045>.
- Mosconi, Lisa. 2013. «Glucose Metabolism in Normal Aging and Alzheimer's Disease: Methodological and Physiological Considerations for PET Studies». *Clinical and Translational Imaging* 1 (4). <https://doi.org/10.1007/s40336-013-0026-y>.
- Mosconi, Lisa, Alberto Pupi, y Mony J. De Leon. 2008. «Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147 (diciembre): 180-95. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.007>.
- Mucke, Lennart, y Dennis J. Selkoe. 2012. «Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Protein: Synaptic and Network Dysfunction». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7): a006338. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006338>.
- Munoz, James R., Brooke R. Stoutenger, Andrew P. Robinson, Jeffrey L. Spees, y Darwin J. Prockop. 2005. «Human Stem/Progenitor Cells from Bone Marrow Promote Neurogenesis of Endogenous Neural Stem Cells in the Hippocampus of Mice». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (50): 18171-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508945102>.

- Nanfaro, Federico, Ricardo Cabrera, Vanesa Bazzocchini, Myrian Laconi, y Roberto Yunes. 2010. «Pregnenolone Sulfate Infused in Lateral Septum of Male Rats Impairs Novel Object Recognition Memory». *Pharmacological Reports: PR* 62 (2): 265-72.
- Nayak, Debasis, Theodore L. Roth, y Dorian B. McGavern. 2014. «Microglia Development and Function». *Annual Review of Immunology* 32: 367-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>.
- Nicolas, Maya, y Bassem A. Hassan. 2014. «Amyloid Precursor Protein and Neural Development». *Development (Cambridge, England)* 141 (13): 2543-48. <https://doi.org/10.1242/dev.108712>.
- Nimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff, y Fritjof Helmchen. 2005. «Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo». *Science (New York, N.Y.)* 308 (5726): 1314-18. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>.
- Nishida, F., G. R. Morel, C. B. Hereñú, J. I. Schwerdt, R. G. Goya, y E. L. Portiansky. 2011. «Restorative Effect of Intracerebroventricular Insulin-like Growth Factor-I Gene Therapy on Motor Performance in Aging Rats». *Neuroscience* 177 (marzo): 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.013>.
- Nishijima, Takeshi, Joaquin Piriz, Sylvie Duflot, Ana M. Fernandez, Gema Gaitan, Ulises Gomez-Pinedo, Jose M. Garcia Verdugo, y col. 2010. «Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS». *Neuron* 67 (5): 834-46. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.007>.
- Njung'e, K., y S. L. Handley. 1991. «Evaluation of Marble-Burying Behavior as a Model of Anxiety». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 38 (1): 63-67.
- Norden, D. M., y J. P. Godbout. 2013. «Review: Microglia of the Aged Brain: Primed to Be Activated and Resistant to Regulation». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39 (1): 19-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x>.
- Novoselova, Elena G., Sergey M. Lunin, Olga V. Glushkova, Maxim O. Khrenov, Svetlana B. Parfenyuk, Nadezhda M. Zakhарова, y Evgeny E. Fesenko. 2018. «Thymulin, Free or Bound to PBCA Nanoparticles, Protects Mice against Chronic Septic Inflammation». *PLOS ONE* 13 (5): e0197601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197601>.
- Ocrant, I., C. T. Fay, y J. T. Parmelee. 1990. «Characterization of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins Produced in the Rat Central Nervous System». *Endocrinology* 127 (3): 1260-67. <https://doi.org/10.1210/endo-127-3-1260>.
- Ojo, Bunmi, Payam Rezaie, Paul L. Gabbott, Heather Davies, Frances Colyer, Thelma R. Cowley, Marina Lynch, y Michael G. Stewart. 2012. «Age-Related Changes in the Hippocampus (Loss of Synaptophysin and Glial-Synaptic Interaction) Are Modified by Systemic Treatment with an NCAM-Derived Peptide, FGL». *Brain, Behavior, and Immunity* 26 (5): 778-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.09.013>.
- O'Kusky, J. R., P. Ye, y A. J. D'Ercole. 2000. «Insulin-like Growth Factor-I Promotes Neurogenesis and Synaptogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus during Postnatal Development». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (22): 8435-42.
- OMS - Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud. WHO. 2015. <http://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/es/>.
- Ott, V., C. Benedict, B. Schultes, J. Born, y M. Hallschmid. 2012. «Intranasal Administration of Insulin to the Brain Impacts Cognitive Function and Peripheral Metabolism». *Diabetes, Obesity & Metabolism* 14 (3): 214-21. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01490.x>.
- Ozkay, Umide Demir, Ozgür Devrim Can, Yusuf Ozkay, y Yusuf Oztürk. 2012. «Effect of Benzothiazole/Piperazine Derivatives on Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Cognitive Deficits». *Pharmacological Reports: PR* 64 (4): 834-47.
- Paidi, Ramesh K., Dominic N. Nthenge-Ngumbau, Raghavendra Singh, Thulasi Kankanala, Hina Mehta, y Kochupurackal P. Mohanakumar. 2015. «Mitochondrial Deficits Accompany Cognitive Decline Following Single Bilateral Intracerebroventricular Streptozotocin». *Current Alzheimer Research* 12 (8): 785-95.
- Panchenko, M. M., R. A. Poltavtseva, N. V. Bobkova, D. V. Vel'meshev, I. V. Nesterova, A. N. Samokhin, y G. T. Sukhikh. 2014. «Localization and Differentiation Pattern of Transplanted Human Multipotent

- Mesenchymal Stromal Cells in the Brain of Bulbectomized Mice». *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 158 (1): 118-22. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2706-7>.
- Paolicelli, Rosa C., Giulia Bolasco, Francesca Pagani, Laura Maggi, Maria Scianni, Patrizia Panzanelli, Maurizio Giustetto, y col. 2011. «Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6048): 1456-58. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>.
- Pardo, Joaquín, Martin C. Abba, Ezequiel Lacunza, Laetitia Francelle, Gustavo R. Morel, Tiago F. Outeiro, y Rodolfo G. Goya. 2017. «Identification of a Conserved Gene Signature Associated with an Exacerbated Inflammatory Environment in the Hippocampus of Aging Rats». *Hippocampus* 27 (4): 435-49. <https://doi.org/10.1002/hipo.22703>.
- Pardo, Joaquín, Martin C. Abba, Ezequiel Lacunza, Olalekan M. Ogundele, Isabel Paiva, Gustavo R. Morel, Tiago F. Outeiro, y Rodolfo G. Goya. 2018. «IGF-I Gene Therapy in Aging Rats Modulates Hippocampal Genes Relevant to Memory Function». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 73 (4): 459-67. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx125>.
- Pardo, Joaquín, Gustavo R. Morel, Mariana Astiz, José I. Schwerdt, Micaela L. León, Silvia S. Rodríguez, Claudia B. Hereñú, y Rodolfo G. Goya. 2014. «Gene Therapy and Cell Reprogramming for the Aging Brain: Achievements and Promise». *Current Gene Therapy* 14 (1): 24-34.
- Pardo, Joaquín, Maia Uriarte, Gloria M. Cónsole, Paula C. Reggiani, Tiago F. Outeiro, Gustavo R. Morel, y Rodolfo G. Goya. 2016. «Insulin-like Growth Factor-I Gene Therapy Increases Hippocampal Neurogenesis, Astrocyte Branching and Improves Spatial Memory in Female Aging Rats». *The European Journal of Neuroscience* 44 (4): 2120-28. <https://doi.org/10.1111/ejn.13278>.
- Park, Hyun-Jung, Giyoon Bang, Bo Ra Lee, Hyun Ok Kim, y Phil Hyu Lee. 2011. «Neuroprotective Effect of Human Mesenchymal Stem Cells in an Animal Model of Double Toxin-Induced Multiple System Atrophy Parkinsonism». *Cell Transplantation* 20 (6): 827-35. <https://doi.org/10.3727/096368910X540630>.
- Pastrana, Erika, Violeta Silva-Vargas, y Fiona Doetsch. 2011. «Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells». *Cell Stem Cell* 8 (5): 486-98. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.007>.
- Pathan, Asif R., Bhoomi Viswanad, Swapnil K. Sonkusare, y Poduri Ramarao. 2006. «Chronic Administration of Pioglitazone Attenuates Intracerebroventricular Streptozotocin Induced-Memory Impairment in Rats». *Life Sciences* 79 (23): 2209-16. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.07.018>.
- Patil, Siddhesh D., David G. Rhodes, y Diane J. Burgess. 2005. «DNA-Based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review». *The AAPS Journal* 7 (1): E61-77. <https://doi.org/10.1208/aapsj070109>.
- Paxinos G, y Watson C. 1998. «The rat brain in stereotaxic coordinates».
- Pendlebury, Sarah T., y Peter M. Rothwell. 2009. «Prevalence, Incidence, and Factors Associated with Pre-Stroke and Post-Stroke Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis». *The Lancet. Neurology* 8 (11): 1006-18. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70236-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70236-4).
- Perl, Daniel P. 2010. «Neuropathology of Alzheimer's Disease». *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* 77 (1): 32-42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>.
- Perluigi, M., F. Di Domenico, A. Giorgi, M. E. Schininà, R. Coccia, C. Cini, F. Bellia, y col. 2010. «Redox Proteomics in Aging Rat Brain: Involvement of Mitochondrial Reduced Glutathione Status and Mitochondrial Protein Oxidation in the Aging Process». *Journal of Neuroscience Research* 88 (16): 3498-3507. <https://doi.org/10.1002/jnr.22500>.
- Perry, V. Hugh, James A. R. Nicoll, y Clive Holmes. 2010. «Microglia in Neurodegenerative Disease». *Nature Reviews. Neurology* 6 (4): 193-201. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>.
- Perry, V. Hugh, y Vincent O'Connor. 2010. «The Role of Microglia in Synaptic Stripping and Synaptic Degeneration: A Revised Perspective». *ASN Neuro* 2 (5): e00047. <https://doi.org/10.1042/AN20100024>.
- Petersen, Ronald C., Joseph E. Parisi, Dennis W. Dickson, Kris A. Johnson, David S. Knopman, Bradley F. Boeve, Gregory A. Jicha, y col. 2006. «Neuropathologic Features of Amnestic Mild Cognitive Impairment». *Archives of Neurology* 63 (5): 665-72. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.5.665>.

- PIMENTEL-COELHO, P.M.; MAGALHAES, E.S.; LOPES, L.M.; DEAZEVEDO, L.C.; SANTIAGO, M.F.; MENDEZ-OTERO, R. (2010) Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum.».
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, y D. R. Marshak. 1999. «Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143-47.
- Plaschke, Konstanze, Juergen Kopitz, Markus Siegelin, Reinhard Schliebs, Melita Salkovic-Petrisic, Peter Riederer, y Siegfried Hoyer. 2010. «Insulin-Resistant Brain State after Intracerebroventricular Streptozotocin Injection Exacerbates Alzheimer-like Changes in Tg2576 AbetaPP-Overexpressing Mice». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 19 (2): 691-704. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1270>.
- Pleau, J. M., M. Dardenne, Y. Blouquit, y J. F. Bach. 1977. «Structural Study of Circulating Thymic Factor: A Peptide Isolated from Pig Serum. II. Amino Acid Sequence». *The Journal of Biological Chemistry* 252 (22): 8045-47.
- Plum, Leona, Markus Schubert, y Jens C. Brüning. 2005. «The Role of Insulin Receptor Signaling in the Brain». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 16 (2): 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.008>.
- Poddar, Jit, Munmun Pradhan, Gargi Ganguly, y Sasanka Chakrabarti. 2018. «Biochemical Deficits and Cognitive Decline in Brain Aging: Intervention by Dietary Supplements». *Journal of Chemical Neuroanatomy*, abril. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.04.002>.
- Pompl, P. N., M. J. Mullan, K. Bjugstad, y G. W. Arendash. 1999. «Adaptation of the Circular Platform Spatial Memory Task for Mice: Use in Detecting Cognitive Impairment in the APP(SW) Transgenic Mouse Model for Alzheimer's Disease». *Journal of Neuroscience Methods* 87 (1): 87-95.
- Poon, H. Fai, Vittorio Calabrese, Giovanni Scapagnini, y D. Allan Butterfield. 2004. «Free Radicals and Brain Aging». *Clinics in Geriatric Medicine* 20 (2): 329-59. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2004.02.005>.
- Praticò, Domenico. 2008. «Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease: A Reappraisal». *Trends in Pharmacological Sciences* 29 (12): 609-15. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.09.001>.
- Prickaerts, J., J. De Vente, W. Honig, H. Steinbusch, null Ittersum MMV, A. Blokland, y H. W. Steinbusch. 2000. «Nitric Oxide Synthase Does Not Mediate Neurotoxicity after an i.c.v. Injection of Streptozotocin in the Rat». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 107 (7): 745-66. <https://doi.org/10.1007/s007020070056>.
- Prickaerts, J., T. Fahrig, y A. Blokland. 1999. «Cognitive Performance and Biochemical Markers in Septum, Hippocampus and Striatum of Rats after an i.c.v. Injection of Streptozotocin: A Correlation Analysis». *Behavioural Brain Research* 102 (1-2): 73-88.
- Prince, Martin, Renata Bryce, Emiliano Albanese, Anders Wimo, Wagner Ribeiro, y Cleusa P. Ferri. 2013. «The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 9 (1): 63-75.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>.
- Prockop, Darwin J., y Joo Youn Oh. 2012. «Medical Therapies with Adult Stem/Progenitor Cells (MSCs): A Backward Journey from Dramatic Results in Vivo to the Cellular and Molecular Explanations». *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (5): 1460-69. <https://doi.org/10.1002/jcb.24046>.
- Qiu, Chengxuan, Miia Kivipelto, y Eva von Strauss. 2009. «Epidemiology of Alzheimer's Disease: Occurrence, Determinants, and Strategies toward Intervention». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 11 (2): 111-28.
- Qu, Changsheng, Asim Mahmood, Dunyue Lu, Anton Goussev, Ye Xiong, y Michael Chopp. 2008. «Treatment of Traumatic Brain Injury in Mice with Marrow Stromal Cells». *Brain Research* 1208 (mayo): 234-39. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.042>.
- Rajasekar, N., Chandishwar Nath, Kashif Hanif, y Rakesh Shukla. 2017. «Intranasal Insulin Improves Cerebral Blood Flow, Nrf-2 Expression and BDNF in STZ (ICV)-Induced Memory Impaired Rats». *Life Sciences* 173 (marzo): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.09.020>.
- Ransohoff, Richard M., y V. Hugh Perry. 2009. «Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses». *Annual Review of Immunology* 27: 119-45. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>.

- Räty, Jani K., Hanna P. Lesch, Thomas Wirth, y Seppo Ylä-Herttuala. 2008. «Improving Safety of Gene Therapy». *Current Drug Safety* 3 (1): 46-53.
- Reggiani, P. C., C. B. Hereñú, O. J. Rimoldi, O. A. Brown, J.-M. Pléau, M. Dardenne, y R. G. Goya. 2006. «Gene Therapy for Long-Term Restoration of Circulating Thymulin in Thymectomized Mice and Rats». *Gene Therapy* 13 (16): 1214-21. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302775>.
- Reggiani, Paula C., Gustavo R. Morel, Gloria M. Cónsole, Claudio G. Barbeito, Silvia S. Rodriguez, Oscar A. Brown, Maria Jose Bellini, Jean-Marie Pléau, Mireille Dardenne, y Rodolfo G. Goya. 2009. «The Thymus-Neuroendocrine Axis: Physiology, Molecular Biology, and Therapeutic Potential of the Thymic Peptide Thymulin». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153 (febrero): 98-106. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03964.x>.
- Reiman, E. M., y R. J. Caselli. 1999. «Alzheimer's Disease». *Maturitas* 31 (3): 185-200.
- Reitz, Christiane, y Richard Mayeux. 2014. «Genetics of Alzheimer's Disease in Caribbean Hispanic and African American Populations». *Biological Psychiatry* 75 (7): 534-41. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.06.003>.
- Rezanejad, Habib, y Maryam M. Matin. 2012. «Induced Pluripotent Stem Cells: Progress and Future Perspectives in the Stem Cell World». *Cellular Reprogramming* 14 (6): 459-70. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0039>.
- Ribeiro-Resende, V. T., P. M. Pimentel-Coelho, L. A. Mesentier-Louro, R. M. B. Mendez, J. P. C. Mello-Silva, M. C. Cabral-da-Silva, F. G. de Mello, R. A. de Melo Reis, y R. Mendez-Otero. 2009. «Trophic Activity Derived from Bone Marrow Mononuclear Cells Increases Peripheral Nerve Regeneration by Acting on Both Neuronal and Glial Cell Populations». *Neuroscience* 159 (2): 540-49. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.059>.
- Richardson, J. C., C. E. Kendal, R. Anderson, F. Priest, E. Gower, P. Soden, R. Gray, y col. 2003. «Ultrastructural and Behavioural Changes Precede Amyloid Deposition in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease». *Neuroscience* 122 (1): 213-28.
- Ringe, Jochen, Christian Kaps, Gerd-Rüdiger Burmester, y Michael Sittinger. 2002. «Stem Cells for Regenerative Medicine: Advances in the Engineering of Tissues and Organs». *Die Naturwissenschaften* 89 (8): 338-51. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0344-9>.
- Rivera, Enrique J., Alison Goldin, Noah Fulmer, Rose Tavares, Jack R. Wands, y Suzanne M. de la Monte. 2005. «Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression and Function Deteriorate with Progression of Alzheimer's Disease: Link to Brain Reductions in Acetylcholine». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 8 (3): 247-68.
- Rodrigues L., Ferreira Dutra M., Ilha J., Biasibetti R., Quincozes-Santos A., Leite M.C., Marcuzzo S., Achaval M. y Gonçalves C.A. 2010. «Treadmill Training Restores Spatial Cognitive Deficits and Neurochemical Alterations in the Hippocampus of Rats Submitted to an Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 117 (11): 1295-1305. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0501-9>.
- Rodríguez, Silvia S., José I. Schwerdt, Claudio G. Barbeito, Mirta A. Flamini, Ye Han, Martha C. Bohn, y Rodolfo G. Goya. 2013. «Hypothalamic IGF-I Gene Therapy Prolongs Estrous Cyclicity and Protects Ovarian Structure in Middle-Aged Female Rats». *Endocrinology* 154 (6): 2166-73. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1069>.
- Rodríguez-Arellano, J. J., V. Parpura, R. Zorec, y A. Verkhratsky. 2016. «Astrocytes in Physiological Aging and Alzheimer's Disease». *Neuroscience* 323 (mayo): 170-82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007>.
- Rönnemaa, E., B. Zethelius, J. Sundelöf, J. Sundström, M. Degerman-Gunnarsson, C. Berne, L. Lannfelt, y L. Kilander. 2008. «Impaired Insulin Secretion Increases the Risk of Alzheimer Disease». *Neurology* 71 (14): 1065-71. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000310646.32212.3a>.
- Rosenbaum, R. Shayna, Gordon Winocur, Malcolm A. Binns, y Morris Moscovitch. 2012. «Remote Spatial Memory in Aging: All Is Not Lost». *Frontiers in Aging Neuroscience* 4: 25. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00025>.

- Rosenberg, C. K., M. A. Pericak-Vance, A. M. Saunders, J. R. Gilbert, P. C. Gaskell, y C. M. Hulette. 2000. «Lewy Body and Alzheimer Pathology in a Family with the Amyloid-Beta Precursor Protein APP717 Gene Mutation». *Acta Neuropathologica* 100 (2): 145-52.
- Rosenfeld, Cheryl S., y Sherry A. Ferguson. 2014. «Barnes Maze Testing Strategies with Small and Large Rodent Models». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n.º 84 (febrero): e51194. <https://doi.org/10.3791/51194>.
- Rostami, Farzaneh, Mohammad Javan, Ali Moghimi, Aliakbar Haddad-Mashadrizeh, y Masoud Fereidoni. 2017. «Streptozotocin-Induced Hippocampal Astrogliosis and Insulin Signaling Malfunction as Experimental Scales for Subclinical Sporadic Alzheimer Model». *Life Sciences* 188 (noviembre): 172-85. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.025>.
- Ryu, B. R., H. W. Ko, I. Jou, J. S. Noh, y B. J. Gwag. 1999. «Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Regulation of Neuronal Apoptosis and Necrosis by Insulin and IGF-I». *Journal of Neurobiology* 39 (4): 536-46.
- Safieh-Garabedian, B., M. D. Kendall, M. A. Khamashta, y G. R. Hughes. 1992. «Thymulin and Its Role in Immunomodulation». *Journal of Autoimmunity* 5 (5): 547-55.
- Safieh-Garabedian, B., C. I. Ochoa-Chaar, S. Poole, C. A. Massaad, S. F. Atweh, S. J. Jabbur, y N. E. Saadé. 2003. «Thymulin Reverses Inflammatory Hyperalgesia and Modulates the Increased Concentration of Proinflammatory Cytokines Induced by i.c.v. Endotoxin Injection». *Neuroscience* 121 (4): 865-73.
- Safieh-Garabedian, Bared, Mireille Dardenne, Jean Marie Pléau, y Nayef E. Saadé. 2002. «Potent Analgesic and Anti-Inflammatory Actions of a Novel Thymulin-Related Peptide in the Rat». *British Journal of Pharmacology* 136 (6): 947-55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704793>.
- Safieh-Garabedian, Bared, Suhayl J. Jabbur, Mireille Dardenne, y Nayef E. Saadé. 2011. «Thymulin Related Peptide Attenuates Inflammation in the Brain Induced by Intracerebroventricular Endotoxin Injection». *Neuropharmacology* 60 (2-3): 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.11.004>.
- Salem, Husein K., y Chris Thiemermann. 2010. «Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (3): 585-96. <https://doi.org/10.1002/stem.269>.
- Salkovic-Petrisic M. y Hoyer S. 2007. «Central Insulin Resistance as a Trigger for Sporadic Alzheimer-like Pathology: An Experimental Approach». *Journal of Neural Transmission. Supplementum* nº 72: 217-33.
- Salkovic-Petrisic, Melita, Ana Knezovic, Siegfried Hoyer, y Peter Riederer. 2013. «What Have We Learned from the Streptozotocin-Induced Animal Model of Sporadic Alzheimer's Disease, about the Therapeutic Strategies in Alzheimer's Research». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 120 (1): 233-52. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>.
- Salkovic-Petrisic, Melita, Ana Knezovic, Jelena Osmanovic-Barilar, Una Smailovic, Vladimir Trkulja, Peter Riederer, Tamar Amit, Silvia Mandel, y Moussa B. H. Youdim. 2015. «Multi-Target Iron-Chelators Improve Memory Loss in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease». *Life Sciences* 136 (septiembre): 108-19. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.06.026>.
- Salkovic-Petrisic, Melita, Jelena Osmanovic, Edna Grünblatt, Peter Riederer, y Siegfried Hoyer. 2009. «Modeling Sporadic Alzheimer's Disease: The Insulin Resistant Brain State Generates Multiple Long-Term Morphobiological Abnormalities Including Hyperphosphorylated Tau Protein and Amyloid-Beta». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 18 (4): 729-50. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1184>.
- Salkovic-Petrisic, Melita, Jelena Osmanovic-Barilar, Martina K. Brückner, Siegfried Hoyer, Thomas Arendt, y Peter Riederer. 2011. «Cerebral Amyloid Angiopathy in Streptozotocin Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease: A Long-Term Follow up Study». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 118 (5): 765-72. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0651-4>.
- Salkovic-Petrisic, Melita, Florian Tribl, Manuela Schmidt, Siegfried Hoyer, y Peter Riederer. 2006. «Alzheimer-like Changes in Protein Kinase B and Glycogen Synthase Kinase-3 in Rat Frontal Cortex and Hippocampus after Damage to the Insulin Signalling Pathway». *Journal of Neurochemistry* 96 (4): 1005-15. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03637.x>.
- Santos, Taisa Oliveira, Caio Henrique Yokoyama Mazucanti, Gilberto Fernando Xavier, y Andréa Silva Torrão. 2012. «Early and Late Neurodegeneration and Memory Disruption after Intracerebroventricular

- Streptozotocin». *Physiology & Behavior* 107 (3): 401-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.019>.
- Saraiva, Leonardo M., Gisele S. Seixas da Silva, Antonio Galina, Wagner S. da-Silva, William L. Klein, Sérgio T. Ferreira, y Fernanda G. De Felice. 2010. «Amyloid- $\beta$  Triggers the Release of Neuronal Hexokinase 1 from Mitochondria». *PloS One* 5 (12): e15230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015230>.
- Sarugaser, Rahul, David Lickorish, Dolores Baksh, M. Morris Hosseini, y John E. Davies. 2005. «Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (2): 220-29. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0166>.
- Sasaki, Toru, Keiko Unno, Shoichi Tahara, Atsuyoshi Shimada, Yoichi Chiba, Minoru Hoshino, y Takao Kaneko. 2008. «Age-Related Increase of Superoxide Generation in the Brains of Mammals and Birds». *Aging Cell* 7 (4): 459-69. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00394.x>.
- Sato, Yasushi, Hironobu Araki, Junji Kato, Kiminori Nakamura, Yutaka Kawano, Masayoshi Kobune, Tsutomu Sato, y col. 2005. «Human Mesenchymal Stem Cells Xenografted Directly to Rat Liver Are Differentiated into Human Hepatocytes without Fusion». *Blood* 106 (2): 756-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0572>.
- Savino, W., y M. Dardenne. 1986. «Thymic Hormone-Containing Cells. VIII. Effects of Colchicine, Cytochalasin B, and Monensin on Secretion of Thymulin by Cultured Human Thymic Epithelial Cells». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 34 (12): 1719-23. <https://doi.org/10.1177/34.12.3782779>.
- Saxena, Gunjan, Ishan K. Patro, y Chandishwar Nath. 2011. «ICV STZ Induced Impairment in Memory and Neuronal Mitochondrial Function: A Protective Role of Nicotinic Receptor». *Behavioural Brain Research* 224 (1): 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.039>.
- Scarmeas, Nikolaos, Lawrence S. Honig, Hyunmi Choi, Julio Cantero, Jason Brandt, Deborah Blacker, Marilyn Albert, y col. 2009. «Seizures in Alzheimer Disease: Who, When, and How Common?». *Archives of Neurology* 66 (8): 992-97. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.130>.
- Schafer, Dorothy P., Emily K. Lehrman, Amanda G. Kautzman, Ryuta Koyama, Alan R. Mardinly, Ryo Yamasaki, Richard M. Ransohoff, Michael E. Greenberg, Ben A. Barres, y Beth Stevens. 2012. «Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner». *Neuron* 74 (4): 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>.
- Schaffer, David V., James T. Koerber, y Kwang-il Lim. 2008. «Molecular Engineering of Viral Gene Delivery Vehicles». *Annual Review of Biomedical Engineering* 10: 169-94. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160514>.
- Scheff, Stephen W., y Douglas A. Price. 2003. «Synaptic Pathology in Alzheimer's Disease: A Review of Ultrastructural Studies». *Neurobiology of Aging* 24 (8): 1029-46.
- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, y col. 1996. «Secreted Amyloid Beta-Protein Similar to That in the Senile Plaques of Alzheimer's Disease Is Increased in Vivo by the Presenilin 1 and 2 and APP Mutations Linked to Familial Alzheimer's Disease». *Nature Medicine* 2 (8): 864-70.
- Schliebs, R., y T. Arendt. 2006. «The Significance of the Cholinergic System in the Brain during Aging and in Alzheimer's Disease». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 113 (11): 1625-44. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0579-2>.
- Schliebs, Reinhard, y Thomas Arendt. 2011. «The Cholinergic System in Aging and Neuronal Degeneration». *Behavioural Brain Research* 221 (2): 555-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>.
- Schmitt, D., J. C. Monier, M. Dardenne, J. M. Pleau, P. Deschaux, y J. F. Bach. 1980. «Cytoplasmic Localization of FTS (Facteur Thymique Sérique) in Thymic Epithelial Cells. An Immunoelectronmicroscopical Study.» *Thymus* 2 (3): 177-86.
- Schwab, Claudia, Sheng Yu, Winnie Wong, Edith G. McGeer, y Patrick L. McGeer. 2013. «GAD65, GAD67, and GABAT Immunostaining in Human Brain and Apparent GAD65 Loss in Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 33 (4): 1073-88. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121330>.

- Scuteri, Arianna, Mariarosaria Miloso, Dana Foudah, Monia Orciani, Guido Cavaletti, y Giovanni Tredici. 2011. «Mesenchymal Stem Cells Neuronal Differentiation Ability: A Real Perspective for Nervous System Repair?» *Current Stem Cell Research & Therapy* 6 (2): 82-92.
- Selkoe, Dennis J. 2005. «Defining Molecular Targets to Prevent Alzheimer Disease». *Archives of Neurology* 62 (2): 192-95. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.2.192>.
- Selkoe, Dennis J., y John Hardy. 2016. «The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years». *EMBO Molecular Medicine* 8 (6): 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.
- Senitz, D., A. Reichenbach, y T. G. Smith. 1995. «Surface Complexity of Human Neocortical Astrocytic Cells: Changes with Development, Aging, and Dementia». *Journal Fur Hirnforschung* 36 (4): 531-37.
- Sequerra, Eduardo B., Marcos R. Costa, João R. L. Menezes, y Cecilia Hedin-Pereira. 2013. «Adult Neural Stem Cells: Plastic or Restricted Neuronal Fates?» *Development (Cambridge, England)* 140 (16): 3303-9. <https://doi.org/10.1242/dev.093096>.
- Serrano-Pozo, Alberto, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, y Bradley T. Hyman. 2011. «Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1): a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>.
- Seth, Prem. 1999. *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*. Austin, TX: R.G. Landes Co.
- Shankar, Ganesh M., Shaomin Li, Tapan H. Mehta, Amaya Garcia-Munoz, Nina E. Shepardson, Imelda Smith, Francesca M. Brett, y col. 2008. «Amyloid-Beta Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer's Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory». *Nature Medicine* 14 (8): 837-42. <https://doi.org/10.1038/nm1782>.
- Sharma, Bhupesh, Nirmal Singh, y Manjeet Singh. 2008. «Modulation of Celecoxib- and Streptozotocin-Induced Experimental Dementia of Alzheimer's Disease by Pitavastatin and Donepezil». *Journal of Psychopharmacology* 22 (2): 162-71. <https://doi.org/10.1177/0269881107081553>.
- Shayakhmetov, Dmitry M., Andrea M. Eberly, Zong-Yi Li, y André Lieber. 2005. «Deletion of Penton RGD Motifs Affects the Efficiency of Both the Internalization and the Endosome Escape of Viral Particles Containing Adenovirus Serotype 5 or 35 Fiber Knobs». *Journal of Virology* 79 (2): 1053-61. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1053-1061.2005>.
- Shen, Jinhui, Yi-Ting Tsai, Nancy M. Dimarco, Michael A. Long, Xiankai Sun, y Liping Tang. 2011. «Transplantation of Mesenchymal Stem Cells from Young Donors Delays Aging in Mice». *Scientific Reports* 1: 67. <https://doi.org/10.1038/srep00067>.
- Shi, Lijuan, Zhihua Zhang, Lin Li, y Christian Hölscher. 2017. «A Novel Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist Alleviates Cognitive Decline by Re-Sensitizing Insulin Signaling in the Alzheimer Icv. STZ Rat Model». *Behavioural Brain Research* 327: 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.032>.
- Shoham, S., C. Bejar, E. Kovalev, y M. Weinstock. 2003. «Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin Causes Neurotoxicity to Myelin That Contributes to Spatial Memory Deficits in Rats». *Experimental Neurology* 184 (2): 1043-52. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.08.015>.
- Shoham, Shai, Corina Bejar, Eugenia Kovalev, Donna Schorer-Apelbaum, y Marta Weinstock. 2007. «Ladostigil Prevents Gliosis, Oxidative-Nitrative Stress and Memory Deficits Induced by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin in Rats». *Neuropharmacology* 52 (3): 836-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.10.005>.
- Sholl, D. A. 1953. «Dendritic Organization in the Neurons of the Visual and Motor Cortices of the Cat». *Journal of Anatomy* 87 (4): 387-406.
- Sierra, Amanda, Andres C. Gottfried-Blackmore, Bruce S. McEwen, y Karen Bulloch. 2007. «Microglia Derived from Aging Mice Exhibit an Altered Inflammatory Profile». *Glia* 55 (4): 412-24. <https://doi.org/10.1002/glia.20468>.
- Silva, Guilherme V., Silvio Litovsky, Joao A. R. Assad, Andre L. S. Sousa, Bradley J. Martin, Deborah Vela, Stephanie C. Coulter, y col. 2005. «Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model». *Circulation* 111 (2): 150-56. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000151812.86142.45>.

- Silva Meirelles, Lindolfo da, Pedro Cesar Chagastelles, y Nance Beyer Nardi. 2006. «Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 11): 2204-13. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>.
- Simen, Arthur A., Kelly A. Bordner, Mark P. Martin, Lawrence A. Moy, y Lisa C. Barry. 2011. «Cognitive Dysfunction with Aging and the Role of Inflammation». *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 2 (3): 175-95. <https://doi.org/10.1177/2040622311399145>.
- Sipe, G. O., R. L. Lowery, M.-È Tremblay, E. A. Kelly, C. E. Lamantia, y A. K. Majewska. 2016. «Microglial P2Y12 Is Necessary for Synaptic Plasticity in Mouse Visual Cortex». *Nature Communications* 7 (marzo): 10905. <https://doi.org/10.1038/ncomms10905>.
- Sivanandam, Thamil Mani, y Mahendra Kumar Thakur. 2012. «Traumatic Brain Injury: A Risk Factor for Alzheimer's Disease». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36 (5): 1376-81. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.013>.
- Sivanesan, Senthilkumar, Aaron Tan, y Jayakumar Rajadas. 2013. «Pathogenesis of Abeta Oligomers in Synaptic Failure». *Current Alzheimer Research* 10 (3): 316-23.
- Smith, D. E., J. Roberts, F. H. Gage, y M. H. Tuszynski. 1999. «Age-Associated Neuronal Atrophy Occurs in the Primate Brain and Is Reversible by Growth Factor Gene Therapy». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (19): 10893-98.
- Spangenberg, Elizabeth E., y Kim N. Green. 2017. «Inflammation in Alzheimer's Disease: Lessons Learned from Microglia-Depletion Models». *Brain, Behavior, and Immunity* 61 (marzo): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.003>.
- Sparkman, Nathan L., y Rodney W. Johnson. 2008. «Neuroinflammation Associated with Aging Sensitizes the Brain to the Effects of Infection or Stress». *Neuroimmunomodulation* 15 (4-6): 323-30. <https://doi.org/10.1159/000156474>.
- Spires, Tara L., Melanie Meyer-Luehmann, Edward A. Stern, Pamela J. McLean, Jesse Skoch, Paul T. Nguyen, Brian J. Bacskai, y Bradley T. Hyman. 2005. «Dendritic Spine Abnormalities in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Demonstrated by Gene Transfer and Intravital Multiphoton Microscopy». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (31): 7278-87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1879-05.2005>.
- Steen, Eric, Benjamin M. Terry, Enrique J. Rivera, Jennifer L. Cannon, Thomas R. Neely, Rose Tavares, X. Julia Xu, Jack R. Wands, y Suzanne M. de la Monte. 2005. «Impaired Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression and Signaling Mechanisms in Alzheimer's Disease--Is This Type 3 Diabetes?». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 7 (1): 63-80.
- Stix, Gary. 2010. «Alzheimer's: Forestalling the Darkness». *Scientific American* 302 (6): 50-57.
- Stoub, Travis R., Leyla deToledo-Morrell, Glenn T. Stebbins, Sue Leurgans, David A. Bennett, y Raj C. Shah. 2006. «Hippocampal Disconnection Contributes to Memory Dysfunction in Individuals at Risk for Alzheimer's Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (26): 10041-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603414103>.
- Stozicka, Zuzana, Norbert Zilka, Petr Novak, Branislav Kovacech, Ondrej Bugos, y Michal Novak. 2010. «Genetic background modifies neurodegeneration and neuroinflammation driven by misfolded human tau protein in rat model of tauopathy: implication for immunomodulatory approach to Alzheimer's disease». *Journal of Neuroinflammation* 7 (octubre): 64. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-64>.
- Streit, Wolfgang J. 2002. «Microglia as Neuroprotective, Immunocompetent Cells of the CNS». *Glia* 40 (2): 133-39. <https://doi.org/10.1002/glia.10154>.
- Streit, Wolfgang J., Robert E. Mrak, y W. Sue T. Griffin. 2004. «Microglia and Neuroinflammation: A Pathological Perspective». *Journal of Neuroinflammation* 1 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-14>.
- Streit, Wolfgang J., Nicole W. Sammons, Amanda J. Kuhns, y D. Larry Sparks. 2004. «Dystrophic Microglia in the Aging Human Brain». *Glia* 45 (2): 208-12. <https://doi.org/10.1002/glia.10319>.
- Strien, N. M. van, N. L. M. Cappaert, y M. P. Witter. 2009. «The Anatomy of Memory: An Interactive Overview of the Parahippocampal-Hippocampal Network». *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (4): 272-82. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>.

- Su, Li, Lawrence Hayes, Soteris Soteriades, Guy Williams, Susannah A. E. Brain, Michael J. Firbank, Giulia Longoni, Robert J. Arnold, James B. Rowe, y John T. O'Brien. 2018. «Hippocampal Stratum Radiatum, Lacunosum, and Moleculare Sparing in Mild Cognitive Impairment». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 61 (1): 415-24. <https://doi.org/10.3233/JAD-170344>.
- Sun, Ping, Ana Knezovic, Milena Parlak, Jacqueline Cuber, Margherita M. Karabeg, Jürgen Deckert, Peter Riederer, Qian Hua, Melita Salkovic-Petrisic, y Angelika G. Schmitt. 2015. «Long-Term Effects of Intracerebroventricular Streptozotocin Treatment on Adult Neurogenesis in the Rat Hippocampus». *Current Alzheimer Research* 12 (8): 772-84.
- Sze, C. I., J. C. Troncoso, C. Kawas, P. Mouton, D. L. Price, y L. J. Martin. 1997. «Loss of the Presynaptic Vesicle Protein Synaptophysin in Hippocampus Correlates with Cognitive Decline in Alzheimer Disease». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56 (8): 933-44.
- Szkudelski, T. 2001. «The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas». *Physiological Research* 50 (6): 537-46.
- Takahashi, Kazutoshi, y Shinya Yamanaka. 2006. «Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors». *Cell* 126 (4): 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Takashima, A. 2010. «Tau Aggregation Is a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease». *Current Alzheimer Research* 7 (8): 665-69.
- Tanaka, M., M. Sawada, S. Yoshida, F. Hanaoka, y T. Marunouchi. 1995. «Insulin Prevents Apoptosis of External Granular Layer Neurons in Rat Cerebellar Slice Cultures». *Neuroscience Letters* 199 (1): 37-40.
- Tara, Shuhei, Kevin A. Rocco, Narutoshi Hibino, Tadahisa Sugiura, Hirotugu Kurobe, Christopher K. Breuer, y Toshiharu Shinoka. 2014. «Vessel Bioengineering». *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 78 (1): 12-19.
- Tatem, Kathleen S., James L. Quinn, Aditi Phadke, Qing Yu, Heather Gordish-Dressman, y Kanneboyina Nagaraju. 2014. «Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n.º 91 (septiembre): 51785. <https://doi.org/10.3791/51785>.
- Taylor, Chanel J., Dhanisha J. Jhaveri, y Perry F. Bartlett. 2013. «The therapeutic potential of endogenous hippocampal stem cells for the treatment of neurological disorders». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (enero). <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00005>.
- Terry, R. D., E. Masliah, D. P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L. A. Hansen, y R. Katzman. 1991. «Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment». *Annals of Neurology* 30 (4): 572-80. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>.
- Tfilin, M., E. Sudai, A. Merenlender, I. Gispan, G. Yadid, y G. Turgeman. 2010. «Mesenchymal Stem Cells Increase Hippocampal Neurogenesis and Counteract Depressive-like Behavior». *Molecular Psychiatry* 15 (12): 1164-75. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.110>.
- The National Institutes of Health - 2018 [stemcells.nih.gov](https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine.htm).
- Thomas, Alexia, April Burant, Nghiêm Bui, Deanna Graham, Lisa A. Yuva-Paylor, y Richard Paylor. 2009. «Marble Burying Reflects a Repetitive and Perseverative Behavior More than Novelty-Induced Anxiety». *Psychopharmacology* 204 (2): 361-73. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1466-y>.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, y J. M. Jones. 1998. «Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391): 1145-47.
- Torres-Aleman, I. 1999. «Insulin-like Growth Factors as Mediators of Functional Plasticity in the Adult Brain». *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselsforschung = Hormones Et Métabolisme* 31 (2-3): 114-19. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978707>.
- Torres-Aleman, I., F. Naftolin, y R. J. Robbins. 1990. «Trophic Effects of Insulin-like Growth Factor-I on Fetal Rat Hypothalamic Cells in Culture». *Neuroscience* 35 (3): 601-8.
- Torres-Aleman, I., S. Pons, y F. F. Santos-Benito. 1992. «Survival of Purkinje Cells in Cerebellar Cultures Is Increased by Insulin-like Growth Factor I». *The European Journal of Neuroscience* 4 (9): 864-69.

- Tremblay, Marie-Ève, Rebecca L. Lowery, y Ania K. Majewska. 2010. «Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience». *PLoS Biology* 8 (11): e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>.
- Tremblaye, Patricia B. de la, Simon M. Benoit, Sarah Schock, y Hélène Plamondon. 2017. «CRHR1 Exacerbates the Glial Inflammatory Response and Alters BDNF/TrkB/CREB Signaling in a Rat Model of Global Cerebral Ischemia: Implications for Neuroprotection and Cognitive Recovery». *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 79 (Pt B): 234-48. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.06.021>.
- Trueba-Sáiz, A, C Cavada, A M Fernandez, T Leon, D A González, J Fortea Ormaechea, A Lleó, T Del Ser, A Nuñez, y I Torres-Aleman. 2013. «Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice». *Translational Psychiatry* 3 (12): e330. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.102>.
- Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, y Vito Pistoia. 2008. «Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease». *Nature Reviews. Immunology* 8 (9): 726-36. <https://doi.org/10.1038/nri2395>.
- Ullah, Imran, Raghavendra Baregundi Subbarao, y Gyu Jin Rho. 2015. «Human Mesenchymal Stem Cells - Current Trends and Future Prospective». *Bioscience Reports* 35 (2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>.
- Uriarte, Maia, Olalekan M. Ogundele, y Joaquin Pardo. 2017. «Long-Lasting Training in the Barnes Maze Prompts Hippocampal Spinogenesis and Habituation in Rats». *Neuroreport* 28 (6): 307-12. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000755>.
- Valtieri, Mauro, y Antonio Sorrentino. 2008. «The Mesenchymal Stromal Cell Contribution to Homeostasis». *Journal of Cellular Physiology* 217 (2): 296-300. <https://doi.org/10.1002/jcp.21521>.
- Veerendra Kumar, M. H., y Y. K. Gupta. 2003. «Effect of Centella Asiatica on Cognition and Oxidative Stress in an Intracerebroventricular Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease in Rats». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 30 (5-6): 336-42.
- Vijayan, V. K., J. W. Geddes, K. J. Anderson, H. Chang-Chui, W. G. Ellis, y C. W. Cotman. 1991. «Astrocyte Hypertrophy in the Alzheimer's Disease Hippocampal Formation». *Experimental Neurology* 112 (1): 72-78.
- Vorhees, Charles V., y Michael T. Williams. 2006. «Morris Water Maze: Procedures for Assessing Spatial and Related Forms of Learning and Memory». *Nature Protocols* 1 (2): 848-58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>.
- Wake, Hiroaki, Andrew J. Moorhouse, Shozo Jinno, Shinichi Kohsaka, y Junichi Nabekura. 2009. «Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses in Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (13): 3974-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>.
- Walker, M. R., K. K. Patel, y T. S. Stappenbeck. 2009. «The Stem Cell Niche». *The Journal of Pathology* 217 (2): 169-80. <https://doi.org/10.1002/path.2474>.
- Walsh, Dominic M., y Dennis J. Selkoe. 2004. «Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease». *Neuron* 44 (1): 181-93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.010>.
- Walsh, R. N., y R. A. Cummins. 1976. «The Open-Field Test: A Critical Review». *Psychological Bulletin* 83 (3): 482-504.
- Wang, Nan, Qinggang Li, Li Zhang, Hongli Lin, Jie Hu, Diangeng Li, Suozhu Shi, y col. 2012. «Mesenchymal Stem Cells Attenuate Peritoneal Injury through Secretion of TSG-6». *PLoS One* 7 (8): e43768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043768>.
- Warmack, Rebeccah A., Eduardo Mansilla, Rodolfo G. Goya, y Steven G. Clarke. 2016. «Racemized and Isomerized Proteins in Aging Rat Teeth and Eye Lens». *Rejuvenation Research* 19 (4): 309-17. <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1778>.
- Waynfirth, H. B. 1980. *Experimental and surgical technique in the rat*. Second ed. Academic Press, London.
- Weinhard, Laetitia, Giulia di Bartolomei, Giulia Bolasco, Pedro Machado, Nicole L. Schieber, Urte Neniskyte, Melanie Exiga, y col. 2018. «Microglia Remodel Synapses by Presynaptic Trogocytosis and Spine Head Filopodia Induction». *Nature Communications* 9 (1): 1228. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>.

- Weinstock, M., y S. Shoham. 2004. «Rat Models of Dementia Based on Reductions in Regional Glucose Metabolism, Cerebral Blood Flow and Cytochrome Oxidase Activity». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 111 (3): 347-66. <https://doi.org/10.1007/s00702-003-0058-y>.
- Werther, G. A., H. Cheesman, y V. Russo. 1993. «Olfactory Bulb Organ Culture Is Supported by Combined Insulin-like Growth Factor-I and Basic Fibroblast Growth Factor». *Brain Research* 617 (2): 339-42.
- West, M. J. 1993. «New Stereological Methods for Counting Neurons». *Neurobiology of Aging* 14 (4): 275-85.
- West M.J., P.D. Coleman, D.G. Flood y J.C. Troncoso. 1994. «Differences in the Pattern of Hippocampal Neuronal Loss in Normal Ageing and Alzheimer's Disease». *Lancet (London, England)* 344(8925):769-72.
- Westwood, Andrew J., Alexa Beiser, Charles DeCarli, Tamara B. Harris, Tai C. Chen, Xue-mei He, Ronenn Roubenoff, y col. 2014. «Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy». *Neurology* 82 (18): 1613-19. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000382>.
- Wiedenmann, B., y W. W. Franke. 1985. «Identification and Localization of Synaptophysin, an Integral Membrane Glycoprotein of Mr 38,000 Characteristic of Presynaptic Vesicles». *Cell* 41 (3): 1017-28.
- Wilcox, Kyle C., Pascale N. Lacor, Jason Pitt, y William L. Klein. 2011. «A $\beta$  Oligomer-Induced Synapse Degeneration in Alzheimer's Disease». *Cellular and Molecular Neurobiology* 31 (6): 939-48. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9691-4>.
- Williams, J. T., S. S. Southerland, J. Souza, A. F. Calcutt, y R. G. Cartledge. 1999. «Cells Isolated from Adult Human Skeletal Muscle Capable of Differentiating into Multiple Mesodermal Phenotypes». *The American Surgeon* 65 (1): 22-26.
- Wimmer, Mathieu E., Pepe J. Hernandez, Jennifer Blackwell, y Ted Abel. 2012. «Aging Impairs Hippocampus-Dependent Long-Term Memory for Object Location in Mice». *Neurobiology of Aging* 33 (9): 2220-24. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.007>.
- Wirths, Oliver, y Thomas A. Bayer. 2010. «Neuron Loss in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease». *International Journal of Alzheimer's Disease* 2010 (agosto). <https://doi.org/10.4061/2010/723782>.
- World Alzheimer Report 2018 - The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers.
- World Population Prospects - Population Division - United Nations 2017. <https://population.un.org/wpp/>.
- Xin, Hongqi, Yi Li, Ben Buller, Mark Katakowski, Yi Zhang, Xinli Wang, Xia Shang, Zheng Gang Zhang, y Michael Chopp. 2012. «Exosome-Mediated Transfer of MiR-133b from Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Neural Cells Contributes to Neurite Outgrowth». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (7): 1556-64. <https://doi.org/10.1002/stem.1129>.
- Yamaguchi F., T. Itano, O. Miyamoto, N.A. Janjua, T. Ohmoto, K. Hosokawa y O. Hatase. 1991. «Increase of extracellular insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration following electrolytical lesion in rat hippocampus». *Neuroscience Letters* 128(2): 273-76. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90278-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90278-2).
- Yan, Ke, Run Zhang, Chengmei Sun, Lei Chen, Peng Li, Yi Liu, Lingmei Peng, y col. 2013. «Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Maintain the Resting Phenotype of Microglia and Inhibit Microglial Activation». *PLoS One* 8 (12): e84116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084116>.
- Yeh, P., y M. Perricaudet. 1997. «Advances in Adenoviral Vectors: From Genetic Engineering to Their Biology». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (8): 615-23.
- Yin, Fei, Harsh Sancheti, Zhigang Liu, y Enrique Cadenas. 2016. «Mitochondrial function in ageing: coordination with signalling and transcriptional pathways». *The Journal of Physiology* 594 (8): 2025-42. <https://doi.org/10.1113/JP270541>.
- Yoo, Seung-Wan, Sung-Soo Kim, Soo-Yeol Lee, Hey-Sun Lee, Hyun-Soo Kim, Young-Don Lee, y Haeyoung Suh-Kim. 2008. «Mesenchymal Stem Cells Promote Proliferation of Endogenous Neural Stem Cells and Survival of Newborn Cells in a Rat Stroke Model». *Experimental & Molecular Medicine* 40 (4): 387-97. <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.4.387>.
- Yuan, J., y B. A. Yankner. 2000. «Apoptosis in the Nervous System». *Nature* 407 (6805): 802-9. <https://doi.org/10.1038/35037739>.
- Yuan, Shauna H., y Mason Shaner. 2013. «Bioengineered Stem Cells in Neural Development and Neurodegeneration Research». *Ageing Research Reviews* 12 (3): 739-48. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.04.002>.

- Zaidi, S. A., M. D. Kendall, B. Gillham, y M. T. Jones. 1988. «The Release of Luteinizing Hormone from Pituitaries Perifused with Thymic Extracts». *Thymus* 12 (4): 253-64.
- Zappa-Villar MF, López-León M, Pardo J, Costa M, Crespo R, Dardenne M, Goya, RG, Reggiani PC. A new adenovector system for implementing thymulin gene therapy for inflammatory disorders. *Mol Immunol.* 2017 Jul;87:180-187. doi: 10.1016/j.molimm.2017.04.014. Epub 2017 May 11. PubMed PMID: 28501652.
- Zappa Villar, MF, López Hanotte J, Falomir Lockhart E, Trípodi LS, Morel GR y Reggiani PC. 2018. «Intracerebroventricular Streptozotocin Induces Impaired Barnes Maze Spatial Memory and Reduces Astrocyte Branching in the CA1 and CA3 Hippocampal Regions». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, septiembre. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>.
- Zarzeczny, Amy, y Timothy Caulfield. 2009. «Emerging Ethical, Legal and Social Issues Associated with Stem Cell Research & and the Current Role of the Moral Status of the Embryo». *Stem Cell Reviews* 5 (2): 96-101. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9062-4>.
- Zemva, Johanna, y Markus Schubert. 2014. «The Role of Neuronal Insulin/Insulin-like Growth Factor-1 Signaling for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Possible Therapeutic Implications». *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 13 (2): 322-37.
- Zhang, Huabiao, Zhiyong Huang, Yuming Xu, y Suming Zhang. 2006. «Differentiation and Neurological Benefit of the Mesenchymal Stem Cells Transplanted into the Rat Brain Following Intracerebral Hemorrhage». *Neurological Research* 28 (1): 104-12. <https://doi.org/10.1179/016164106X91960>.
- Zhang, Rui, Ming Zhao, Hai-Jie Ji, Yu-He Yuan, y Nai-Hong Chen. 2013. «Study on the Dynamic Changes in Synaptic Vesicle-Associated Protein and Axonal Transport Protein Combined with LPS Neuroinflammation Model». *ISRN Neurology* 2013: 496079. <https://doi.org/10.1155/2013/496079>.
- Zhao, Wei-Qin, Hui Chen, Michael J. Quon, y Daniel L. Alkon. 2004. «Insulin and the Insulin Receptor in Experimental Models of Learning and Memory». *European Journal of Pharmacology* 490 (1-3): 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.045>.
- Zhao, Wei-Qin, Fernanda G. De Felice, Sara Fernandez, Hui Chen, Mary P. Lambert, Michael J. Quon, Grant A. Krafft, y William L. Klein. 2008. «Amyloid Beta Oligomers Induce Impairment of Neuronal Insulin Receptors». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (1): 246-60. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7703com>.
- Zhao, X. H., A. Awaya, H. Kobayashi, T. Ohnuki, Y. Tokumitsu, y Y. Nomura. 1990. «Effects of Repeated Administrations of Facteur Thymique Sérique (FTS) on Biochemical Changes Related to Aging in Senescence-Accelerated Mouse (SAM)». *Japanese Journal of Pharmacology* 53 (3): 311-19.
- Zhi-Gang, Zhao, Li Wei-Ming, Chen Zhi-Chao, You Yong, y Zou Ping. 2008. «Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patient with Hematological Malignant Diseases». *Leukemia & Lymphoma* 49 (11): 2187-95. <https://doi.org/10.1080/10428190802455875>.
- Zuba-Surma, Ewa K., Wojciech Wojakowski, Zbigniew Madeja, y Mariusz Z. Ratajczak. 2012. «Stem Cells as a Novel Tool for Drug Screening and Treatment of Degenerative Diseases». *Current Pharmaceutical Design* 18 (18): 2644-56.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, y M. H. Hedrick. 2001. «Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies». *Tissue Engineering* 7 (2): 211-28. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>.