

# Informe final publicable de proyecto

## La hormona concentradora de melanina: efectos sobre el aprendizaje y la memoria y potencial efecto benéfico en un modelo pre-clínico de Enfermedad de Alzheimer

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2017\_1\_136039

18/10/2021

**LAGOS SMEJA, Patricia Friné** (Responsable Técnico - Científico)

**RODRÍGUEZ DA FONSECA, Fernando** (Investigador)

**NIÑO RIVERO, Sofía Tatiana** (Investigador)

**RUIZ VIROGA, Vicente** (Investigador)

**CABRAL RODRIGUEZ, Rossana Beatriz** (Investigador)

**CANCELA BRUNO, Saira** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\  
HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO DE MÁLAGA \\  
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

## Resumen del proyecto

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas. En este proyecto caracterizamos un modelo experimental de EA inducido por administración intracerebral de estreptozotocina (STZ) en ratas, evaluando sus efectos a los 15, 30, 60, 90 y 120 días post-STZ, comparados con grupos controles. Observamos una disminución en la cantidad de neuronas, aumento en densidad de astrocitos en corteza e hipocampo, y una disminución en la cantidad de neuronas y densidad de fibras colinérgicas desde los 15 días post-STZ. Sin embargo, los déficits cognitivos observados en el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso, fueron observados a los 90 y 120 días post-STZ al comparar con grupos control. Estos resultados fundamentan la utilización de este modelo con otras preguntas relevantes para estudiar sistemas de neurotransmisión que pudieran estar modificados. Nos propusimos estudiar los efectos sobre la memoria de la hormona concentradora de melanina (MCH), un neuropéptido hipotalámico, para posteriormente evaluar sus efectos en el modelo de EA. A pesar de que diversas evidencias apuntan a que la MCH mejora los procesos de aprendizaje y memoria, en este proyecto demostramos que la administración aguda de MCH intra-hipocampal a dosis altas indujo efectos pro-amnésicos que fueron acompañados con una disminución significativa en la expresión del MCHR-1, receptor de la MCH y en el TrkB, receptor para la neurotrofina BDNF, también implicada en procesos de memoria. El desarrollo de esta propuesta en nuestro grupo de trabajo, favoreció el establecimiento de estos ensayos comportamentales y de este modelo pre-clínico de EA, y consolidó la colaboración con investigadores argentinos e incorporó la colaboración con investigadores españoles para la realización de ensayos bioquímicos y moleculares. En el contexto de este proyecto, se realizaron dos tesis de Maestría y una tesis de Doctorado de estudiantes de nuestro laboratorio.

**Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Neurociencias (incluye Psicofisiología) / Neurociencias del comportamiento y neuroanato**

**Palabras clave: hormona concentradora de melanina / aprendizaje y memoria / enfermedad de Alzheimer /**

## Introducción

La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa irreversible caracterizada por un deterioro continuo y progresivo de las funciones cognitivas, principalmente de la memoria. En 2013, 35.6 millones de personas vivían con demencia en el mundo, siendo la EA la más común de ellas (1). Esta enfermedad constituye un serio problema de salud pública con un impacto socioeconómico muy importante para las familias de personas afectadas y los sistemas de salud, en especial en países de bajos recursos. Esta situación podría agravarse en el futuro debido al envejecimiento de la población.

Se han descrito dos tipos de EA, una de tipo familiar de comienzo temprano y otra de tipo esporádico de comienzo tardío (2). Las lesiones fisiopatológicas de cerebros post-mortem en pacientes con EA se caracterizan por acumulación anormal del péptido  $\beta$  amiloide, presente en las placas seniles extracelulares, de la proteína Tau truncada e hiperfosforilada, presente en los ovillos neurofibrilares intracelulares, de la pérdida de neuronas colinérgicas y de la presencia de microglía activada, en determinadas estructuras del SNC (3). Se han elaborado distintas hipótesis al respecto de su etiología. La "hipótesis de cascada de amiloide" establece que el péptido  $\beta$  amiloide inicia la cascada de eventos que induce a neuroinflamación, daño vascular, neurodegeneración y pérdida de memoria (4). Otra hipótesis establece que la formación de ovillos neurofibrilares precede a los depósitos de  $\beta$  amiloide (5, 6). Por otra parte, la "hipótesis colinérgica" se estableció debido al déficit colinérgico observado en cerebros de pacientes con EA y por el rol que cumple la acetilcolina en procesos de aprendizaje y memoria (7); este déficit ha llevado al desarrollo de fármacos cuyo mecanismo de acción es bloquear a la enzima acetilcolinesterasa (8).

A pesar de las hipótesis planteadas y del gran volumen de investigaciones realizadas, aún se desconoce la etiología de la EA y no se ha podido encontrar una cura, lo cual denota la importancia de estudiar nuevos blancos moleculares para el desarrollo de terapias alternativas efectivas para el tratamiento de esta enfermedad.

Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer

Resulta imprescindible contar con modelos animales para el estudio de la EA, ya que es imposible estudiar el comienzo y progresión de las modificaciones bioquímicas en el cerebro del ser humano. Surgieron los modelos de ratones

transgénicos que reproducían las características fisiopatológicas de la EA en humanos. Sin embargo, estos modelos presentan limitaciones, ya que la muerte neuronal no se desarrolla en un curso temporal como ocurre en los pacientes con EA (10), y además, imitan la EA de tipo familiar de comienzo temprano (5% de los casos), no representando la forma esporádica de comienzo tardío, que representa el 95% de los casos de EA (11).

Por dicha razón, surgieron modelos de EA esporádica de comienzo tardío, como el modelo que consta de la microinyección intracerebroventricular (i.c.v.) del péptido  $\beta$  amiloide, o de una mezcla de compuestos que inducen modificaciones fisiopatológicas similares a la EA, denominado ferrous amyloid buthionine (11, 12, 13) o el modelo en el cual se realiza la microinyección i.c.v. de streptozotocina (STZ).

**Modelo in vivo de EA esporádica: administración central de estreptozotocina**

Diversas evidencias relacionan a la EA esporádica con un desajuste en la señalización de la insulina cerebral, por lo cual se ha reconocido a la EA como un estado cerebral de resistencia a la insulina (14, 15), tipo de desorden neuroendócrino denominado "Diabetes de tipo-III" (16,17). La homeostasis de la insulina cerebral y de su receptor es esencial en el aprendizaje y memoria (16). En roedores, el ARNm de los dos genes de insulina y su receptor se expresan de forma específica en las células piramidales del hipocampo, cortezas prefrontal y entorinal, entre otras estructuras, donde está presente también el transportador de la glucosa (18). La insulina estaría afectando el aprendizaje y la memoria a través del metabolismo de la glucosa, lo que afectaría de gran manera la modulación y funcionamiento correcto de la neurotransmisión.

En base a estas evidencias, surgió un modelo animal de EA esporádica: la administración i.c.v. de STZ en ratas para inducir una disfunción en la insulina cerebral (14,19).

La STZ es una glucosamina derivada de la nitrosourea que por vía sistémica destruye las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, internalizándose a través del transportador de la glucosa y causando Diabetes mellitus de tipo I (20). Intracelularmente, la STZ causa daños irreparables en el ADN, estrés oxidativo y peroxidación de lípidos que causan la muerte celular.

Por su parte, la administración i.c.v. de STZ en dosis subdiabetogénicas, induce neurodegeneración en determinadas áreas del SNC, déficits colinérgicos y cognitivos progresivos que comparten características en común a los observados en pacientes con EA esporádica. Se induce así un estado cerebral de resistencia a la insulina, deficiencia en niveles de insulina cerebrales y modificaciones en el metabolismo de la glucosa, aunque no se observan modificaciones en los niveles de glucosa sistémica (21, 22). La STZ i.c.v. también altera la expresión de factores de transcripción, factores neurotróficos, y causa disfunción en neurotransmisores, receptores y transportadores (23). El mal funcionamiento de la señalización de la insulina y del metabolismo energético, a su vez, contribuirían a la formación de depósitos del péptido  $\beta$  amiloide y a la hiperfosforilación de Tau observada en la EA esporádica (24).

Algunas de las modificaciones morfológicas y comportamentales observadas en el cerebro de ratas del modelo de STZ han sido descritas de forma extensa (14, 18, 22, 25, 26, 27). Knezovic et al. (2015) exploraron distintas dosis de STZ, evaluando sus efectos desde una semana hasta 9 meses después. Se describieron déficits cognitivos, dosis y tiempo dependiente, así como diversas modificaciones morfológicas, como una disminución en el grosor de la corteza cerebral y pérdida de fibras del cuerpo calloso, y la presencia de la proteína Tau hiperfosforilada en la corteza temporal e hipocampo (26). Por su parte, Santos et al. (2012), observaron que solamente a las tres horas post-STZ había una disrupción temprana de la memoria de trabajo al ser evaluados en el laberinto acuático de Morris, mientras que los procesos degenerativos del hipocampo los observaron un día y 15 días después de la STZ (28).

**La hormona concentradora de melanina (MCH): efectos sobre el aprendizaje y la memoria.**

La MCH es un neuropéptido que en roedores funciona como un neurotransmisor/neuromodulador presente en neuronas del hipotálamo postero-lateral y zona incerta (29, 30). Desde el hipotálamo, las neuronas MCHérgicas distribuyen sus fibras difusamente al bulbo olfatorio, la corteza cerebral, hipocampo, núcleo accumbens, hipotálamo y núcleos del rafe, entre otros (30). Activa dos tipos de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G, el MCHR-1 -único funcional en roedores- y el MCHR-2. El ARNm para el MCHR-1 está presente en las estructuras inervadas por la MCH (31). Al activar dicho receptor, el complejo MCH/MCHR-1 se internaliza y se desencadenan eventos que inhiben la descarga de dicha neurona (32).

La MCH participa en el metabolismo energético, modula los estados de ánimo, el ciclo sueño-vigilia y participa en los procesos de consolidación de la memoria, entre otras funciones (33,34, 35). Varios estudios apoyan la hipótesis de que durante el sueño se restaura la energía y se produce la consolidación de la memoria, por lo cual existiría un nexo importante entre los circuitos que modulan estas funciones, en los cuales la MCH está involucrada (35).

Las fibras MCHérgicas inervan regiones clave en el aprendizaje y memoria, como hipocampo, septum, corteza cerebral y

núcleo accumbens, estructuras que presentan en gran densidad el transcrito del MCHR-1 (31). Nuestro grupo ha determinado que luego de la administración i.c.v. de la MCH conjugada con rodamina (MCH-ROD), las neuronas piramidales del hipocampo y neuronas del núcleo accumbens son las que más captan el complejo MCH-ROD/MCHR-1, y que dicha captación es dependiente del receptor, pues es parcialmente inhibida por un antagonista de los MCHR-1, y también que es dependiente de la clatrina, proteína que recubre las vesículas para ser endocitadas (Ruiz-Viroga et al., 2021).

Son escasas las evidencias que han demostrado que la MCH tiene un rol importante en los procesos de aprendizaje y memoria. La administración intra-hipocampal e intra-amigdalina de MCH indujo un aumento en la retención de memoria en el test de esquivia inhibitoria en ratas, sugiriendo que la MCH afecta las funciones cognitivas y emocionales, induciendo una mejora (36). Dichos efectos pueden adjudicarse al aumento de la eficacia sináptica inducido por MCH al ser analizados sus efectos in vitro en rodajas de hipocampo, lo cual fue acompañado de un aumento en los niveles de óxido nítrico y GMPc (37). También en rodajas de hipocampo, se mostró que la MCH aumentó la eficacia sináptica en la potenciación a largo plazo a través de un mecanismo NMDA-dependiente, pues se registró un sobre-expresión de las subunidades para dicho receptor (38, 39).

Por otra parte, en ratones knock-out para el MCHR-1, también se puso en evidencia el rol que juega la MCH en procesos de aprendizaje y memoria (40, 41).

Sin embargo, a pesar de esta serie de evidencias, no han sido descritos los efectos agudos y crónicos de la MCH administrada por vía i.c.v., para poner en evidencia sus efectos en varias de las estructuras que participan en el aprendizaje y la memoria y dilucidar si este neuropéptido endógeno podría ser empleado como una nueva herramienta terapéutica para mejorar el aprendizaje y memoria y de esta forma, pudiera revertir déficits cognitivos evidenciados en algún modelo de EA.

Estudio de los efectos mnémicos agudos y crónicos de la MCH en el modelo in vivo de EA: aportes de este proyecto a la temática de estudio

Basándonos en el efecto de la MCH de mejoría de los procesos de aprendizaje y memoria, en la densa inervación MCHérgica y presencia de MCHR-1 en estructuras del SNC relacionadas a tales procesos, y en la internalización receptor-dependiente observada de la MCH-ROD, en este Proyecto nos propusimos estudiar los efectos mnémicos de la MCH como una probable herramienta farmacológica endógena del SNC para mejorar el aprendizaje y memoria. Así también, nuestra hipótesis era que, de producir dichos efectos, la MCH pudiera atenuar los déficits cognitivos y morfológicos observados en un modelo experimental de EA. Por otra parte, nos propusimos estudiar las modificaciones que pudieran estar ocurriendo en el sistema MCHérgico en el SNC de los animales de dicho modelo. Este grupo de aproximaciones resultarían en el desarrollo de una propuesta novedosa y original a ser desarrollada.

Con un enfoque multidisciplinario y complementario, nos propusimos evaluar tanto en los animales del modelo de EA como en animales tratados con MCH de forma aguda y crónica, parámetros comportamentales utilizando la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON) y el laberinto en cruz elevado modificado (LCEm), así como parámetros morfológicos, cuantificando número de neuronas, de glías y de neuronas colinérgicas, del péptido  $\beta$  amiloide, la proteína Tau hiperfosforilada, de fibras MCHérgicas, del receptor MCHR-1, y parámetros bioquímicos evaluando distintos marcadores por western-blot, PCRs o ELISA.

A partir del desarrollo de este Proyecto, establecimos este modelo in vivo de EA en nuestro laboratorio, montamos los dos ensayos comportamentales planteados, ahondamos en el desarrollo de herramientas de análisis morfológico y bioquímico, y reforzamos la colaboración con investigadores del Instituto Leloir de Argentina, así como establecimos una nueva e importante colaboración con investigadores del Hospital Universitario de Málaga, lo cual ha resultado en un gran aporte al desarrollo de esta línea de investigación fortaleciendo esta propuesta y otras a futuro.

El Dr. Pablo Galeano del Instituto Leloir se ha incorporado a nuestro grupo, siendo Investigador asociado de PEDECIBA e investigador del SIN de la ANII, y actuando como co-orientador de la tesis de Maestría-Proinbio de Rossana Cabral y de la tesis de Doctorado-PEDECIBA de Vicente Ruiz.

## **Metodología/diseño del estudio**

### **1.- Animales**

Se utilizaron ratas macho Wistar (250-300 gr) de la URBE de la Facultad de Medicina, mantenidos con ciclo luz-oscuridad (12-12 horas), comida y agua ad libitum. Todos los estudios fueron conducidos de acuerdo a normas éticas de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (protocolo N° 070153-000011-17) y por personal con acreditación (42).

### **2.- Grupos experimentales realizados**

Grupo I) Modelo animal de Enfermedad de Alzheimer.

Los animales fueron administrados por vía i.c.v. con estreptozotocina (STZ, 3 mg/kg por rata (bilateral, 5 $\mu$ l/lado), el día 1 y

el día 3 de la secuencia experimental) o su vehículo, para posteriormente ser analizados a los 15, 30, 60, 90 y 120 días después (a cada tiempo, se evaluaron n=10 vehículo (controles) y n=10 STZ). En el proyecto original se iban a realizar solamente los grupos de 15, 30 y 60, pero al desarrollar el proyecto, fueron incorporados los grupos de 90 y 120 días. Pasado ese tiempo, a dichos animales se les realizaron las pruebas comportamentales de reconocimiento del objeto novedoso (RON) y del laberinto en cruz elevado modificado (LCEm). Posteriormente, les fue extraído el líquido cefalorraquídeo (LCR) de la cisterna magna para la cuantificación de los niveles de la hormona concentradora de melanina (MCH) por ELISA. A continuación, a la mitad de cada grupo, se los procesó para obtener los cerebros fijados para los estudios morfológicos y a la otra mitad, se los procesó para obtener muestras frescas de distintas estructuras del sistema nervioso central (SNC) que fueron congeladas para realizar estudios bioquímicos.

Grupo II) Administración intra-hipocampal de MCH y vehículo.

Los animales fueron implantados con cánulas guía y a los cinco días fueron evaluados en el ensayo del RON, recibiendo microinyecciones bilaterales hipocampales de MCH (o vehículo) a diferentes dosis (25, 50, 200 y 500 ng). Algunos de dichos animales fueron ensayados tres días después en el LCEm y sacrificados luego del término del ensayo, para procesar sus cerebros para estudios morfológicos. A otro grupo de animales, tratados con MCH 200 ng, luego del RON le fueron extraídos sus cerebros en fresco y congelados enteros para ser enviados a Málaga (laboratorio del Dr. Rodríguez da Fonseca) para ser analizados por western blot y PCR.

Grupo III) Administración i.c.v. de MCH y vehículo vía microbombas.

Los animales fueron implantados con cánulas especiales conteniendo catéteres conectados a microbombas (200µl, Alzet, tipo 2002, 15 días de liberación lenta, flujo 0.5µl/hora). Se realizaron varios subgrupos experimentales para evaluar los efectos de la administración crónica de MCH en el RON. Luego de culminados los ensayos comportamentales, los animales fueron sacrificados y perfundidos para obtener los cerebros para ensayos morfológicos.

3.- Implantes de cánulas guía para administración i.c.v. de STZ o vehículo y para administración intra-hipocampal de MCH o vehículo (grupos I y II)

A los animales anestesiados (ketamina 90 mg/kg; xilazina 5 mg/kg i.p.) se le fijaron con acrílico las cánulas guías (26 G) para la administración i.c.v. de STZ y vehículo en las coordenadas: AP= -1 mm; L= -2 y +2 mm; DV= 3.4 mm desde Bregma, y en las coordenadas: AP: -3.6 mm; L: ± 2.8 mm, DV: -3.1, para la administración intra-hipocampal, según atlas de Paxinos y Watson (43). Posteriormente, fueron tratados con antibióticos locales, sistémicos y analgésicos.

4.- Ensayos comportamentales

Se realizaron dos tipos de pruebas comportamentales: la prueba de RON, y el LCEm. Se basaron en protocolos estandarizados por Galeano et al. (2014) y López et al. (2017) (49, 50).

Durante los tres días previos a realizar estos ensayos, el experimentador realizó la manipulación sensorial de los animales (handling) para evitar influencias de stress o ansiedad.

a) Prueba de RON. Evalúa una memoria homóloga a la episódica en humanos. Se basa en la conducta espontánea de los roedores a la exploración de objetos novedosos en detrimento de otros familiares. Se realizó en una caja de 60 x 40 x 40 cm (47, 48). Consistió en un día de habituación a la caja de registro (campo abierto, CA), luego un ensayo de muestra (EM, 5 min) realizado al día siguiente y el ensayo de retención realizado 24 hs después (ER, 5 min). Durante el EM el animal exploró dos objetos idénticos (familiares), mientras que durante el ER uno de dichos objetos familiares fue reemplazado por uno de diferentes características (novedoso).

b) Laberinto en cruz elevado modificado (LCEm)

El ensayo del LCEm es utilizado para analizar la capacidad de retención de memoria espacial de los roedores (Itoh et al., 1991; López et al., 2017). Se realizó en un dispositivo que consta de una cruz elevada de madera en la cual dos de sus brazos contienen paredes (brazos cerrados) y los otros dos no (brazos abiertos). Dicha estructura se encuentra a 50 cm del piso. En este ensayo se cuantificó la latencia de transferencia (LT) que es el tiempo en que los roedores demoran en desplazarse desde el extremo de uno de los brazos abiertos (situación aversiva, por la altura y espacio vacío) a la intersección con los brazos cerrados (situación menos aversiva y segura). Se realizó exponiendo a los animales al LCEm durante tres días consecutivos (denominados LT1, LT2 y LT3) separados por intervalos de 24 horas entre sí. Los animales control durante LT1 demoran más tiempo, y que una vez aprendido el recorrido con ayuda de claves distales, demoran progresivamente menos tiempo en llegar a los brazos cerrados en LT2 y LT3.

Modelo de Laberinto en Cruz Elevado modificado utilizado para registrar el parámetro de latencia de transferencia.

#### 5.- Extracción de LCR

A los animales de todos los grupos experimentales se les extrajo LCR bajo anestesia para analizar el contenido de MCH por ELISA utilizando un kit comercial de Phoenix Pharmaceuticals. Debido a que no fue posible obtener LCR con un volumen suficiente (100 µl) y calidad adecuada (límpida, sin sangre agregada) en la gran mayoría de las muestras, solamente fueron analizadas las muestras de LCR del grupo I.

#### 6.- Procesamiento de tejidos y ensayos de inmunohistoquímica

Luego de haber extraído el LCR, los animales fueron perfundidos intracardiamente con NaCl y paraformaldehído (PFA) 4%. El encéfalo permaneció 24 horas en PFA y 48 hs en sacarosa 30%. Luego se congeló en hielo seco y almacenó a -80 para luego obtener cortes coronales a congelación a nivel de la corteza cerebral, hipocampo e hipotálamo. Las secciones clasificadas se almacenaron a -20 °C para su posterior procesamiento.

El procedimiento de inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB) consistió en la incubación con anticuerpo primario, anticuerpo secundario biotinilado, complejo avidina-biotina con peroxidasa de rábano y con DAB. Para la inmunofluorescencia, tanto simple como doble, se incubaron con los distintos anticuerpos primarios y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo. Estos procedimientos son estándar y sus detalles técnicos se encuentran publicados (44, 45). Se utilizaron anticuerpos primarios anti-NeuN, para identificar neuronas, anti-ChAT, para identificar neuronas y fibras colinérgicas, anti-GFAP para identificar astrocitos, anti-Iba1, para identificar microglía, anti-MCH para identificar fibras MCHérgicas, anti-MCHR-1, para identificar sus receptores, anti-péptido  $\beta$  amiloide y anti-proteína Tau hiperfosforilada para identificar las estructuras típicas y características de la EA.

7.-Análisis de datos. Se compararon los efectos de las inyecciones de drogas y sus vehículos en los distintos parámetros registrados en los modelos comportamentales mediante el one-way ANOVA y el posthoc de Tukey. La hipótesis nula se rechazó con un  $P < 0.05$ . Los análisis comportamentales se realizaron en base a los publicados (49, 50). Para los análisis morfológicos, se tomaron fotos de las estructuras elegidas, en una secuencia específica, cuantificando los elementos positivos mediante ImageJ. Se realizaron los análisis estadísticos correspondientes para este tipo de análisis, como ya fue publicado (44, 45).

### Resultados, análisis y discusión

#### 1) Resultados obtenidos con el Grupo experimental I: modelo animal de EA

##### a) Ensayo de RON

A los 15 y 30 días de la inyección i.c.v. bilateral de STZ (o LCR) no se presentaron déficits en la prueba de RON (Figuras 1 y 2, anexo I).

En los grupos de 60 días, a los 3 min, como la interacción no es significativa (y por ende no podemos hacer análisis post-hoc) nos tenemos que atener a la interpretación de los efectos principales. Estos indican que el factor "Tipo de objeto" resulta significativo pero el factor "Tratamiento" no. Por lo tanto, concluimos que independientemente del tratamiento (CON60 o STZ60) hubo una mayor exploración del objeto novedoso. Sin embargo, cuando analizamos la razón de discriminación (d2) para el grupo CON60 es significativa mientras que para STZ60 no (Figura 3). A los 5 min los resultados son similares a los de 3 min. Sin embargo, cuando analizamos la razón de discriminación (d2) se pierde la significación del grupo control. Podríamos interpretar que a los 60 días empieza a esbozarse algún problema cognitivo en el grupo STZ, por lo menos cuando analizamos d2 a los 3 minutos.

A los 90 días de la inyección i.c.v. bilateral de STZ (o LCR) se observa un marcado déficit en la prueba de RON en el grupo STZ 90, mientras que el grupo CTL 90 ha resuelto correctamente la tarea (Figura 4).

En el grupo de 120 días, a los 3 minutos cuando se analiza el d2 se ve claramente que el grupo CON 120 resolvió exitosamente la prueba mientras que el grupo STZ 120 no (Figura 5). Por el contrario, a los 5 minutos la interacción sí fue significativa y se pudieron realizar los análisis post-hoc que indicaron que el grupo CON 120 exploró significativamente más el objeto novedoso mientras que el grupo STZ 120 no. Este último resultado se ve reforzado por el d2, donde el grupo CON 120 presenta valores significativamente mayores a 0 mientras que el grupo STZ 120 no (Figura 5). Por lo tanto, a los 120 días de la inyección i.c.v. bilateral de STZ se observa un marcado déficit en la prueba de RON, mientras que el grupo CON 120 ha resuelto correctamente la tarea.

##### b) Ensayo de LCEm

El grupo CON 15 no mostró el comportamiento esperable, mostrando latencias más bajas el día 1 en relación al 2. Sin

embargo, el grupo STZ 15 mostró un comportamiento normal (primera latencia alta y siguientes latencias en disminución). En relación a los grupos CON 30 y STZ 30 mostraron un comportamiento normal, sin diferencias entre los tratamientos, con una disminución de la latencia que se produce recién el tercer día. En relación a los grupos CON 60 y STZ 60 ninguno se comportó normalmente. El grupo CON 60 mostró latencias más bajas el día 1 en relación al 2 y el grupo STZ 60 no mostró prácticamente cambios a lo largo de los días. En relación a los grupos de 90 y 120 días, los CON no mostraron un comportamiento normal. En el caso del grupo CON 90 no hay disminución de la latencia de escape a lo largo de los días (Figura 19, d). En el caso del grupo CON 120, se observa un aumento de la latencia en el 2do día (aunque no significativo) para luego volver a reducirse al tercer día, aunque no resulta significativa la reducción en comparación al día 1. O sea que este grupo control (CON 120) no presenta un comportamiento "normal" (Figura 6).

c) Ensayos morfológicos: inmunohistoquímica para detección de neuronas, glías, neuronas colinérgicas y receptor MCHR-1. Se observó una disminución significativa en la cantidad de neuronas identificadas con el marcador neuronal NeuN en la corteza parietal (figura 7, Anexo I), giro dentado (figura 8) y regiones CA1 y CA2 del hipocampo (no mostrado) a partir de los 15 días post-STZ comparados con grupos control. En otros casos, se observó dicha disminución a partir de los 30 días y se mantuvo a los 60 días.

En cuanto a la cantidad de neuronas colinérgicas ChAT (+), también se evidenció una disminución significativa en su número en la corteza parietal (figura 9) y en la densidad de fibras colinérgicas en el hipocampo (no mostrado).

Se detectó una astrogliosis, denotada por un aumento significativo en la densidad de astrocitos GFAP (+), a partir de los grupos de STZ15 adelante (figura 10). En el cuerno de Ammon y giro dentado se obtuvieron resultados similares (no mostrados).

Los ensayos de inmunofluorescencia para detectar y cuantificar el receptor MCHR-1 en el hipocampo y giro dentado de los grupos experimentales, fue realizado en los grupos de 15, 30 y 60 días post-STZ. Los MCHR-1 se detectaron en las cilias primarias de neuronas de dichas estructuras. No fueron observadas diferencias significativas en el número de MCHR-1 en relación a los núcleos DAPI (+) en ninguno de los grupos STZ comparados con los controles. En el giro dentado fue observada una disminución en el largo de las cilias MCHR-1 (+) al comparar STZ versus controles.

## 2) Resultados obtenidos con el Grupo experimental II: administración intra-hipocampal de MCH y vehículo.

### a) Ensayo de RON

La inyección bilateral intra-hipocampal de MCH fue realizada inmediatamente después del EM (0,5  $\mu$ L, flujo de 0,2  $\mu$ L/min) utilizando una bomba de microinyección. Los controles fueron tratados con NaCl 0.9% bajo las mismas condiciones.

A las 24 horas de la inyección de MCH (25 ng), durante el ER, se observó en las ratas controles una mayor exploración del objeto novedoso (ON) en comparación con el familiar (Fig. 1A) y, una relación de discriminación significativamente mayor a cero (Fig. 1B). El mismo patrón de exploración se observó en los grupos tratados con MCH 25 ng (Fig. 1C) y, por lo tanto, presentaron un índice de discriminación significativamente mayor a cero (Fig. 1D).

El grupo de MCH 50 ng mostró un patrón similar al de 25 ng, en el que tanto el grupo control como los tratados con MCH exploraron por un tiempo significativamente mayor el ON que el OF (Fig. 2A y C). El índice de discriminación tanto para MCH como para los controles fueron diferentes a 0 (Fig. 2B y D).

Para MCH (200 ng), durante el ER se observó que las ratas exploraron durante un tiempo similar el ON y el OF (Fig. 3C) con una relación de discriminación próxima a cero, indicando un efecto pro-amnésico (Fig. 3D). Por el contrario, el grupo control exploró significativamente más tiempo el ON que el OF (Fig. 3A) con un índice de discriminación significativamente mayor a cero (Fig. 3B).

El grupo tratado con 500 ng de MCH exhibió en el RON también un efecto pro-amnésico como con la dosis de 200 ng sobre la discriminación del ON, reflejado en valores de discriminación próximos a 0 (fig. 4D) y en tiempos de exploración del ON similares o inferiores a los tiempos correspondientes al OF (fig. 4B). En contrapartida, los controles demostraron ser capaces de discriminar el ON del OF, lo cual se reflejó en tiempos de exploración del ON superiores a los tiempos de exploración del OF (fig. 4A) y valores superiores a 0 para los índices de discriminación (fig. 4B).

En conclusión: con las dosis de 200 y 500 ng observamos un efecto pro-amnésico en el RON, mientras que con las dosis de 25 y 50 ng observamos un efecto pro-cognitivo de la MCH al ser administrada de forma bilateral intra-hipocampal.

### b) Ensayo de LCEm

La inyección de MCH o su vehículo intra-hipocampal bilateral se realizó inmediatamente luego del LT1 utilizando las mismas condiciones de inyección especificadas para el ensayo de RON. Se utilizaron los mismos grupos experimentales

que para el RON, dejando 3 días entre ambos ensayos comportamentales.

El ensayo de mEPM demostró que la inyección de 25 y 50 ng MCH redujo significativamente la latencia de transferencia en LT2 y LT3 (Fig. 5A y B, respectivamente). Al igual que en el ensayo de RON, los tratamientos con MCH intra-hipocampal a dosis de 25 y 50 ng no exhibieron efectos negativos sobre la memoria. Los resultados indicaron que el tratamiento con MCH a dosis bajas disminuyó la latencia de transferencia en LT2.

En los tratamientos con dosis de 200 y 500 ng de MCH, los resultados observados permitieron apreciar un efecto de tipo pro-amnésico de la microinyección, reflejado en el aumento de la latencia de transferencia en LT2 que los controles (Fig. 6).

En conclusión: los resultados obtenidos en los ensayos comportamentales demuestran que las dosis de 25 y 50 ng no ejercieron los efectos pro-amnésicos descritos para las dosis de 200 y 500 ng. A pesar de no observarse afecciones en la retención de memorias, estos resultados muestran que estas dosis bajas de MCH no ejercen un efecto beneficioso sobre la memoria evaluada con este tipo de ensayo.

### c) Análisis bioquímicos

Para estos ensayos, realizados en Málaga, se procesaron los hipocampos de animales tratados intra-hipocampalmente con MCH 200 ng, con NaCl 0.9% (controles) y con MCH 200 ng y un antagonista de los receptores MCHR-1 (ATC, 1mM), debido a los efectos pro-amnésicos obtenidos en el RON con dicha dosis. Fueron realizados ensayos de western blot para cuantificar los niveles de expresión del MCHR-1 y de diversas subunidades de los receptores NMDA (R1, R2A y R2B) del glutamato y niveles del factor neurotrófico BDNF y su receptor TrkB.

Al analizar los niveles de expresión de las proteínas por western blot, se observó una disminución significativa en los niveles del receptor MCHR-1 y del receptor TrkB en los hipocampos de animales tratados con MCH 200 ng comparados con sus controles y con MCH+ATC. No se detectaron modificaciones en los niveles de BDNF y de las tres subunidades de los receptores NMDA para glutamato entre los tres grupos experimentales (Figuras 7 y 8).

### Conclusiones y recomendaciones

Como conclusiones de los resultados obtenidos del desarrollo de este proyecto, podemos enumerar:

- 1) Pusimos a punto y caracterizamos a fondo el modelo animal de EA inducido por la administración i.c.v. de STZ en ratas en nuestro laboratorio, evaluando tanto desde el punto de vista comportamental como en distintos aspectos de la morfología con marcadores a nivel del SNC desde grupos experimentales a los 15 días hasta grupos evaluados hasta 120 días post-STZ.
- 2) Evidenciamos que las modificaciones morfológicas en el hipocampo y corteza de los animales se ponen en evidencia de forma temprana, desde los 15 días post-STZ, observándose un menor número de neuronas en general y de neuronas y fibras colinérgicas, además de un aumento en el número de astrocitos.
- 3) Sin embargo, desde el punto de vista cognitivo, se observaron déficits a un tiempo más avanzado post-STZ, a los 90 días y se mantuvieron en el grupo de los 120 días post-STZ.
- 4) Dichos resultados han sido muy importantes y significativos pues ponen en evidencia la fortaleza del modelo in vivo de Enfermedad de Alzheimer, el cual muestra déficits morfológicos al poco tiempo de ser tratados con STZ y déficits en los procesos de memoria en un estadio más avanzado. Estos resultados se pueden asimilar a los que suceden en los pacientes que son diagnosticados con EA. De hecho, las evidencias apuntan a que cuando se observan los déficits en la memoria, los déficits morfológicos con pérdida de neuronas en general, pérdida de neuronas e inervación colinérgica, aumento en la astrogliosis, etc. ya ocurrieron y conformarían el sustento morfológico de la aparición de los déficits cognitivos.
- 5) También, a partir del desarrollo de este proyecto de investigación, se establecieron dos ensayos comportamentales de memoria en nuestro laboratorio, el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso y el laberinto en cruz elevado modificado.
- 6) Por otra parte, a pesar de tener evidencias preliminares, observamos que el sistema MCHérgico podría estar modificado en el cerebro de los animales que recibieron STZ a etapas más tardías, a partir de los 60 días post-STZ, donde se detectaron cilias primarias marcadas con el MCHR-1 de menor longitud al comparar con los grupos controles.
- 7) Otra evidencia importante obtenida con estos resultados, es la cuantificación de los niveles de MCH en el LCR por ELISA. Detectamos una modificación en dichos niveles a los 60 días post-STZ, que podría mantenerse a lo largo de los grupos de 90 y 120 días post-STZ. Dichos resultados deben confirmarse al obtener mayor cantidad de muestras de LCR de grupos experimentales a realizar a futuro.
- 8) Se estudió el efecto agudo en los procesos de memoria de la MCH al ser administrada por vía intra-hipocampal y se puso en evidencia de que la MCH a dosis de 200 y 500 ng produce efectos pro-amnésicos en el ensayo de reconocimiento

del objeto novedoso. Dichos resultados se contrarrestan a los observados por trabajos anteriores, donde se observaron efectos pro-cognitivos, de mejora de la memoria. Es de destacar que las herramientas utilizadas así como los modelos son diferentes. Nuestros resultados comportamentales están avalados por los resultados bioquímicos donde ante la administración de MCH 200 ng, se observó una disminución significativa en los niveles de expresión del MCHR-1 y también del receptor TrkB en los hipocampos de animales tratados. Es probable que esta disminución en el MCHR-1 se haya puesto en evidencia por el incremento en la disponibilidad del ligando endógeno, la MCH.

#### Recomendaciones:

Este modelo experimental in vivo de EA es un muy buen modelo para ser utilizado en animales de experimentación (ratas) y poner en evidencia diversas modificaciones tanto a nivel comportamental como morfológico. Es un modelo al cual se le pueden hacer distinto tipo de preguntas evaluando las modificaciones que pudieran ocurrir en otros sistemas de neurotransmisión endógeno como pudiera ser el llevado por otros neuropéptidos, sistema canabinoide, etc.

Resulta un modelo sencillo de implementar, de bajo costo y manipulación, utilizando técnicas y metodología de fácil acceso en laboratorios que manejan las técnicas estereotáxicas y de inmunohistoquímica como el nuestro. Es importante destacar los tiempos de espera que se deben considerar para obtener resultados concluyentes y el gran número de animales que deben de ser tratados con STZ y sus controles para obtener resultados confiables desde el punto de vista comportamental, morfológico y bioquímico.

## Referencias bibliográficas

- (1) OMS, OPS (2013) Demencia, una prioridad de salud Pública. Washington DC. ISBN 978 92 4 156445 8
- (2) Acosta, D., Brusco, LI, Fuentes, P., Guerra, M., Mena, R., Nitrini, R., Trujillo de los Santos, Z, Ventura, RL (2012) La enfermedad de Alzheimer, diagnóstico y tratamiento: una perspectiva latinoamericana. Ed. Medica Latinoamericana.
- (3) De Strooper, B (2010) Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. *Physiol Rev* 90: 465–494
- (4) Hardy JA, Higgins GA Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256(5054):184-5.
- (5) J.L. Price, JL, Morris, JC (2004) So what if tangles precede plaques? *Neurobiology of Aging* 25 (2004) 721–723
- (6) Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. (2016) Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond)*.16(3):247-53.
- (7) Baskin DS, Browning JL, Pirozzolo FJ, Korporaal S, Baskin JA, Appel SH. (1999) Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 56(9):1121-3.
- (8) Fontan, L (2012) La Enfermedad de Alzheimer: elementos para el diagnóstico y manejo clínico en el consultorio. *Revista Biomedicina* 7: 34-43.
- (9) Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, Sun S, Lee MH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX. (2013) A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol*. 2013 Apr;47(2):711-25.
- (10) Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, Bholat Y, Vasilevko V, Glabe CG, Breunig JJ, Rakic P, Davtayan H, Agadjanyan MG, Kepe V, Barrio JR, Bannykh S, Szekely CA, Pechnick RN, Town T (2013) A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric  $\alpha\beta$ , and frank neuronal loss. *J Neurosci*. 2013 Apr 10;33(15):6245-56.
- (11) Lecanu, L., Papadopoulos, V (2013) Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. *Alzheimer's Research & Therapy* 2013, 5:17
- (12) Franco R, Cedazo-Minguez A (2014) Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front Pharmacol*. 5:146.
- (13) Blokland A, van Goethem N, Heckman P, Schreiber R, Prickaerts J. (2014) Translational issues with the development of cognition enhancing drugs. *Front Neurol*.5:190
- (14) Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. (1990) Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res*. 532 (1-2):95-100.
- (15) Hoyer S, Müller D, Plaschke K. (1994) Desensitization of brain insulin receptor. Effect on glucose/energy and related metabolism. *J Neural Transm Suppl*. 44:259-68
- (16) de la Monte SM, Wands JR (2008) Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol*. 2(6):1101-13.
- (17) Pilcher H. (2006) Alzheimer's disease could be "type 3 diabetes". *Lancet Neurol*. 5(5):388-9
- (18) Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. (2007) Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl*. (72):217-33.
- (19) Duelli R, Schröck H, Kuschinsky W, Hoyer S. (1994) Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci*. 12(8):737-43.
- (20) Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 50(6):537-46.
- (21) Nitsch R, Hoyer S (1991) Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett*. 128(2):199-202
- (22) Plaschke K, Hoyer S. (1993) Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci*. 11(4):477-83.
- (23) Grünblatt E, Hoyer S, Riederer P. (2004) Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 111(3):367-86
- (24) Lannert H, Hoyer S.(1998) Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci*. 112(5):1199-208.
- (25) S. Lenzen (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes *Diabetologia* (2008) 51:216–226
- (26) Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. (2013) What have we learned from the streptozotocin-induced

animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm (Vienna)* 120(1):233-52.

(27) Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. (2015) Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 122(4):577-92

(28) Santos TO, Mazucanti CH, Xavier GF, Torrão AS. (2012) Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav.* 2012 Oct 10;107(3):401-13

(29) Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M. and Baker, B.I., Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries., *Nature*, 305 (1983) 321-323.

(30) Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W. and Sawchenko, P.E., The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization, *J Comp Neurol*, 319 (1992) 218-45.

(31) Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F.M. and Civelli, O., Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain, *J Comp Neurol*, 435 (2001) 26-40.

(32) Hawes BE, Kil E, Green B, O'Neill K, Fried S, Graziano MP. (2000) The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 141: 4524-4532.

(33) Torterolo P, Lagos P, Monti JM. (2011) Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Frontiers in Neurology.* 2 (14): 1-12.

(34) Adamantidis A, de Lecea L. (2009) A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. *Peptides.* 30 (11): 2066-70. 2009.

(35) Jego S, Adamantidis A. (2013) MCH neurons: vigilant workers in the night. *Sleep.* 36: 1783-1786. 2013.

(36) Monzon ME, de Souza MM, Izquierdo LA, Izquierdo I, Barros DM, de Barioglio SR. (1999) Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides.* 20(12):1517-9

(37) Varas M, Pérez M, Ramírez O, de Barioglio SR. (2002a) Melanin concentrating hormone increase hippocampal synaptic transmission in the rat. *Peptides* 23(1):151-5.

(38) Varas M, Pérez M, Monzón ME, de Barioglio SR. (2002 b) Melanin-concentrating hormone, hippocampal nitric oxide levels and memory retention. *Peptides* 23(12):2213-21.

(39) Varas MM, Pérez MF, Ramírez OA, de Barioglio SR (2003) Increased susceptibility to LTP generation and changes in NMDA-NR1 and -NR2B subunits mRNA expression in rat hippocampus after MCH administration. *Peptides.* 24(9):1403-11.

(40) Adamantidis A, Thomas E, Foidart A, Tyhon A, Coumans B, Minet A, Tirelli E, Seutin V, Grisar T, Lakaye B. (2005) Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. *Eur J Neurosci.* 21(10):2837-44.

(41) Pachoud B, Adamantidis A, Ravassard P, Luppi PH, Grisar T, Lakaye B, Salin PA (2010) Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. *J Neurophysiol.* 104(3):1417-25.

(42) "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; 7a edición, National Academy Press, Washington D.C., 2011".

(43) Paxinos, G. and Watson, C. (2005) *The rat brain*, Academic Press, New York.

(44) Torterolo P, Lagos P, Sampogna S, Chase MH (2008) Melanin-concentrating hormone (MCH) immunoreactivity in non-neuronal cells within the raphe nuclei and subventricular region of the brainstem of the cat. *Brain Res.* 1210:163-78

(45) Urbanavicius J, Lagos P, Torterolo P, Abin-Carriquiry JA, Scorza C (2016) Melanin-concentrating hormone projections to the dorsal raphe nucleus: An immunofluorescence and in vivo microdialysis study. *J Chem Neuroanat.* 72:16-24.

(46) Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 751(1):37-46.

(47) Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 31(1):47-59.

(48) Ennaceur A. (2010) One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res.* 215(2):244-54.

(49) Galeano P, Martino Adami PV, Do Carmo S, Blanco E, Rotondaro C, Capani F, Castaño EM, Cuello AC, Morelli L (2014) Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Front Behav Neurosci.* 8:321.

(50) Lopez-Hill, X., Richeri, A., Scorza, M.C. (2017) Clozapine blockade of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM: Role of 5-HT 1A receptors and hippocampal BDNF levels. *Physiol Behav* 179:346-352.

(51) Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297(5868):681-3.

(52) Vorhees CV, Williams MT (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848-58.

## **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)