



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MARCADORES DE INHIBICIÓN SINÁPTICA (GAD y SOM) EN EL
HIPOCAMPO DEL MODELO TRANSGENICO PARA LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Israel Poblano Paez

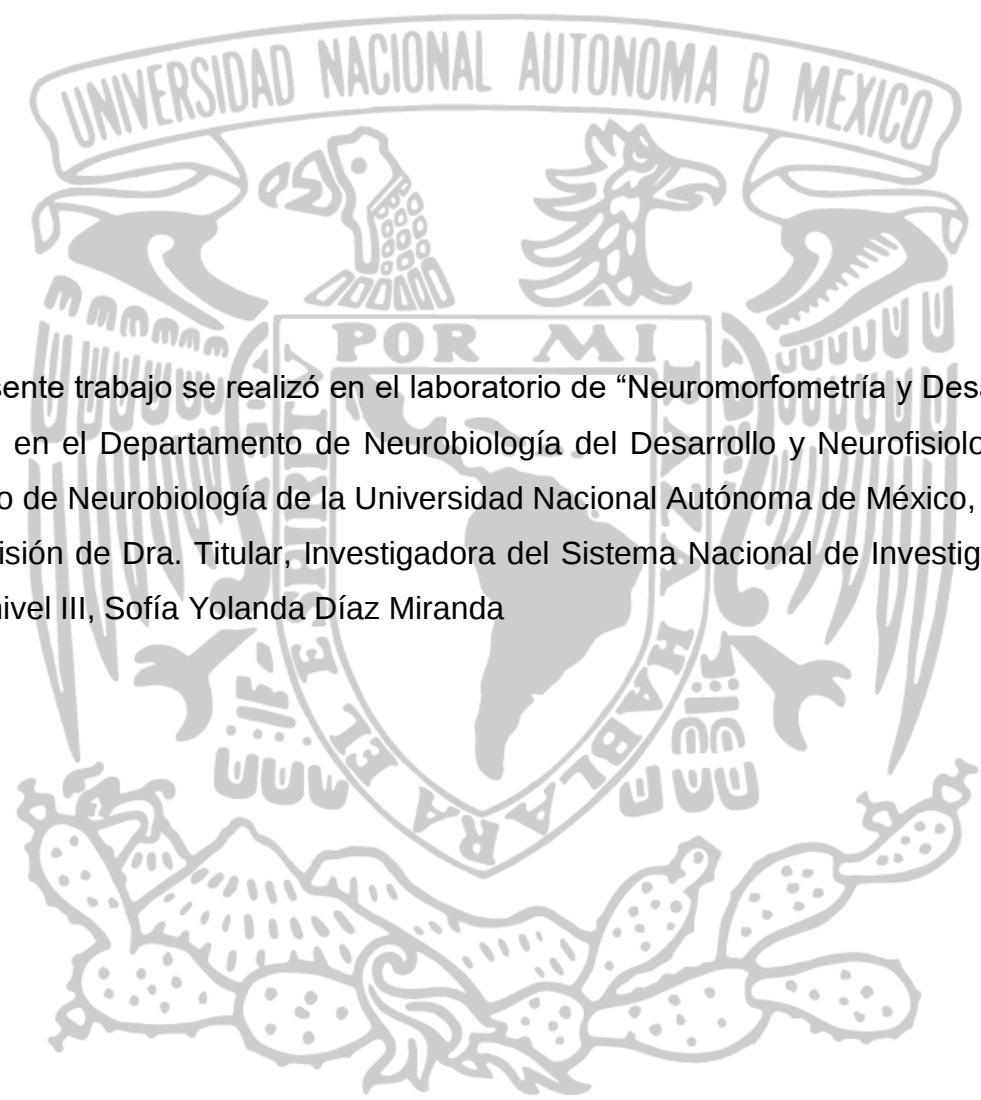
DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Instituto de Neurobiología, UNAM

MES Y AÑO
01/2021





El presente trabajo se realizó en el laboratorio de “Neuromorfometría y Desarrollo” (C-02), en el Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología de Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión de Dra. Titular, Investigadora del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel III, Sofía Yolanda Díaz Miranda

Agradecimientos Institucionales

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla mi *Alma Mater*, por brindarme los recursos tanto humanos como materiales para mi formación, para mi crecimiento y desarrollo intelectual y social.

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme los apoyos requeridos para la realización de mi tesis como apoyos económicos a través de las becas DGAPA-UNAM (IN-201613-2) y CONACYT (CB-178841) , así como el espacio en sus laboratorios y aulas,

A la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, por aceptarme como alumno y parte de su grupo de trabajo, por brindarme el proyecto el cual es ahora mi tesis y por su asesoría en técnicas, análisis y revisión de la tesis.

Al técnico académico Azucena Ruth Aguilar Vázquez por su apoyo y asesoría en la aplicación de las técnicas requeridas en el trabajo.

Al técnico académico Carlos Lozano Flores, por su asesoría y apoyo en la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica.

A la M. en C. Nelly Jovana Pasten Castrejón, por su asesoría y apoyo en las técnicas del proyecto, así como el análisis de imágenes y la revisión del escrito.

Al M. en C. Isaac Vargas Rodríguez, por su apoyo y asesoría en el uso y manipulación de programas computacionales, así como la toma, captura y análisis de imágenes.

A la Dra. Berenice, por ser parte de mi comité, por sus comentarios y revisiones sobre la tesis.

A la M. en C. Montserrat por ser parte de mi comité, por sus comentarios y revisiones sobre la tesis.

A la Dra. Aleidy Patricia Martínez por ser parte de mi comité, por sus comentarios y revisiones sobre la tesis.

Al M.V.Z. Martín García por su asesoría y apoyo técnico en el cuidado, mantenimiento y crianza de los animales del bioterio.

A la Dra. Alejandra Castillo por su especial ayuda en la manipulación de mis animales experimentales y por estar siempre atenta de mis necesidades dentro y fuera del bioterio.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopia por su apoyo técnico en la captura de imágenes y asesoría en microscopía confocal.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más común de las demencias, se caracteriza por un declive progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas. Las investigaciones para entender como ocurre el deterioro de la memoria en este proceso neurodegenerativo son extensas y han generado diferentes propuestas de posibles mecanismos que incluyen múltiples factores; estrés oxidativo, disfunción sináptica y muerte neuronal por oligómeros tóxicos del péptido β -amiloide, excitotoxicidad por fallas en la recaptación de glutamato, taupatías, neuroinflamación y de manera muy importante se propone la hiperexcitabilidad ocasionada por la disminución o pérdida de la función inhibitoria. Dentro del funcionamiento sináptico del tejido cerebral, la modulación entre los sistemas de excitación-inhibición tiene un papel fundamental, ya que las alteraciones de dicha regulación, pueden desencadenar cambios en las funciones cognitivas y motoras. Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio se centró en caracterizar posibles cambios en la densidad de las células, que sintetizan y señalizan a partir del ácido γ -amino butírico (GABA), interneuronas inhibitorias GABAérgicas (IG). Para lo cual, se emplearon ratones transgénicos 3xTg-AD, que han sido utilizados como modelos de la patología tipo Alzheimer, a las edades de 12 meses (12m) y 18 meses (18m). Se cuantifico la densidad de IG positivas a somatostatina (SOM^+) y la densidad de IG positivas a la enzima glutamato descarboxilasa (GAD^{67+}) en el *Subiculum* (Sub) en 3 estratos del hipocampo de la región CA1, en el estrato *Oriens* (EO), estrato *Pyramidalis* (EP) y estrato *Radiatum* (ER). Estas regiones cerebrales están involucradas con la memoria y en donde se ha observado que el fracaso de la inhibición GABAérgica puede producir hiperexcitabilidad en la EA. Los resultados mostraron reducciones significativas del número de IG SOM^+ a los 12m y 18m en el área CA1, específicamente en el EO y en el área del Sub. También se encontró una disminución en el número de IG SOM^+ entre las edades (NoTg-12m vs NoTg-18m y 3xTg-AD-12m vs 3xTg-AD-18), en el EO, en el CA1 total y en el Sub.

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, interneuronas, GABA, somatostatina, inhibición sináptica.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common of the dementias, characterized by a progressive decline in memory and other cognitive functions. Research to understand how memory impairment occurs in this neurodegenerative process is extensive and has generated different proposals for possible mechanisms that include multiple factors; oxidative stress, synaptic dysfunction and neuronal death due to toxic oligomers of the β -amyloid peptide, excitotoxicity due to glutamate reuptake failures, tauopathy, neuroinflammation and the significant hyperexcitability caused by the decrease and loss of inhibitory function is highly proposed. Within the synaptic functioning of brain tissue, modulation between excitation-inhibition systems has a fundamental role, since alterations in said regulation can trigger changes in cognitive and motor functions. Due to the above, the objective of this study focused on characterizing possible changes in the density of cells, which synthesize and signal GABAergic inhibitory interneurons (IG) from γ -amino butyric acid (GABA). We were used 3xTg-AD transgenic mice, which have been used as models of Alzheimer's-like pathology, at the ages of 12 months (12m) and 18 months (18m). The density of somatostatin positive IGs (SOM+) and the density of positive IGs for the enzyme glutamate decarboxylase (GAD67+) were quantified in the Subiculum (Sub) in 3 strata of the hippocampus of the CA1 region, in the Oriens stratum (EO), Pyramidalis stratum (EP) and Radiatum stratum (ER). These brain regions are involved with memory and where it has been observed that the failure of GABAergic inhibition can produce hyperexcitability in AD. The results showed significant reductions in the number of IG SOM+ at 12m and 18m in the CA1 area, specifically in the EO and in the Sub area. A decrease in the number of IG SOM+ was also found between the ages (NoTg-12m vs NoTg-18m and 3xTg-AD-12m vs 3xTg-AD-18), in the EO, in the total CA1 and in the Sub

Key words: Alzheimer's disease, interneurons, GABA, somatostatin, synaptic inhibition.

Índice

Introducción	9
Antecedentes	11
Demencia y Enfermedad de Alzheimer	11
Péptido β A.....	13
Alzheimer y GABA	14
Interneuronas GABAérgicas	15
Somatostatina	16
Glutamato Descarboxilasa	17
Formación Hipocampal	18
Modelo Triple Transgénico Para La EA (3xtg-AD)	¡Error! Marcador no definido.
Planteamiento Del Problema	21
Hipótesis	21
Objetivos	21
General	21
Particulares.....	22
Material Y Métodos	22
Animales	22
Procesamiento del Tejido.....	22
Anticuerpos y Fluorocromos	23
Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica	23
Microscopia y Análisis de Imagen	23
Análisis Estadístico	24
Resultados	24
Disminución de Interneuronas en el 3xtg-AD a los 12 meses.....	24
El número de células IG-SOM ⁺ decrece a los 18 meses en el ratón 3xtg-AD.....	26
IG-SOM ⁺ e IG-GAD ⁶⁷⁺ disminuyen con la edad.....	28
Discusión	30
Bibliografía	33

Introducción

La regulación de la función sináptica y la excitabilidad neuronal es importante para las funciones del cerebro, es un mecanismo orquestado por la co-activación de neuronas excitatorias e inhibitorias, cuya alteración puede desencadenar cambios a nivel cognitivo y motor. La desregulación del sistema excitatorio está asociado con desordenes psiquiátricos como epilepsia, esquizofrenia, y algunos tipos de demencia sobresalientes como el Parkinson y la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Fuhrer *et al.*, 2017; Shetty y Bates, 2016). La EA, es la patología más común de las demencias, se caracteriza por un declive progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas, asociadas a lesiones neuropatológicas que incluyen la formación de placas causadas por la deposición del péptido β -amiloide (β A) y marañas neurofibrilares (MNF) ocasionadas por la hiperfosforilación anormal de la proteína tau.

El deterioro de la memoria ha dado lugar a extensas investigaciones que abordan diferentes mecanismos, desde la inducción de toxicidad por la acumulación anómala de β A que se ha relacionado con la muerte neuronal, la falla sináptica, el estrés oxidativo, la disfunción de la proteína tau, el estado neuroinflamatorio y la excitotoxicidad por glutamato, aunado a la hiperexcitabilidad por falla en la inhibición GABAérgica (Barrow y Small, 2007; Jo *et al.*, 2014). Estas alteraciones en la red neuronal se han observado en pacientes y en modelos de experimentación animales, por lo que se postuló la hipótesis de que la actividad excitatoria aberrante ocurre por aumento en la transmisión glutamatérgica, exacerbando así la patogénesis de la EA. Debido a lo anterior, la alteración inhibitoria de las redes neuronales se ha propuesto como posible evento causal en la patogénesis temprana de la EA (Hijazi *et al.*, 2019; Villette y Dutar, 2017). El ácido γ -amino butírico (GABA) tiene un rol importante en la modulación de la excitabilidad neuronal y actúa como el principal neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central (SNC), en células neuronales integradoras, llamadas interneuronas GABAérgicas (IG), que se apoyan del GABA y algunos péptidos como la somatostatina (SOM), la parvalbúmina (PV), y el neuropéptido Y (NPY) para realizar su función fundamental que es, regular la excitación del tejido nervioso (Fuhrer *et al.*, 2017;

Palop y Mucke, 2016). Las interneuronas tienen un rol significativo en la regulación de los niveles de activación del hipocampo, ya que los procesos de aprendizaje y memoria requieren un balance de excitación/inhibición en la actividad neuronal (Shetty y Bates, 2016).

Por lo anterior, en esta investigación se propuso la hipótesis de que las alteraciones sinápticas de la formación hipocampal (FH) están dadas por la disminución de marcadores de inhibición de IG, para probarlo utilizamos el modelo de ratón transgénico para la EA (3xTg-AD) que imita el déficit conductual asociado a la memoria y el proceso temporal y espacial de la patología, generando en el cerebro las marcas histopatológicas clásicas de la enfermedad como amiloidosis, taupatía y patrones inflamatorios, debido a la sobreexpresión del gen de presenilina 1 (PS1M146V), la proteína precursora amiloide (APP^{swe}) y la proteína asociada a microtúbulos tau (tauP3001). En este modelo, se evaluó en hembras de 12 meses (12m) y 18 meses (18m) de edad la cantidad de IG positivas para SOM (SOM⁺) y la cantidad de IG positivas para glutamato descarboxilasa (GAD⁶⁷⁺) en la FH, dividida en: *Subiculum* (Sub) y en 3 estratos del hipocampo de la región CA1 estrato *Oriens* (EO), estrato *Pyramidalis* (EP) y estrato *Radiatum* (ER). Los resultados mostraron reducciones significativas del número de IG SOM⁺ entre las dos edades y entre cada estrato con respecto a los controles. Así, a los 18m, en el EO, CA1 total y en el Sub, mientras que a los 12m solo se encontraron cambios en el EO y en el Sub.

Este trabajo contribuye a la caracterización del modelo 3xTg-AD, sobre parte del sistema inhibitorio representado por las IG, SOM y la enzima GAD⁶⁷. Los resultados obtenidos aquí son similares a los encontrados en el cerebro humano con Alzheimer. Los datos abundan y proponen nuevas estrategias de estudio para futuras investigaciones acerca de los mecanismos celulares involucrados sobre la SOM y su función con relación a procesos de aprendizaje y memoria en este modelo.

Antecedentes

Demencia y EA

La prevalencia de demencia en el mundo es tan alta que alcanza una cifra de 24 millones de personas y se espera que para el 2050 esta cifra se cuadruplique, la demencia produce un deterioro progresivo en la cognición, la función y el comportamiento (Reitz y Mayeux, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud la demencia es una de las principales causas de dependencia y discapacidad en adultos mayores. La EA es considerada la forma de demencia más común, responsable del 90% de los casos (Montoliu-Gaya y Villegas, 2015). La EA es una patología de tipo neurodegenerativo e irreversible y los síntomas son representados por un declive cognitivo, pérdida de la memoria, confusión, problemas con la lectura, escritura y para hablar (Calcul *et al.*, 2012). En México, la prevalencia de la EA es del 7.3% y la incidencia de 27.3 por cada 1000 personas/año. Además, las proyecciones estiman que para el año 2050 habrá 3.5 millones de adultos mayores afectados por la EA (Gutierrez-Robledo y Arrieta-Cruz, 2015).

Existen dos formas reconocidas de la EA, familiar y esporádica, en el primer caso es causada por factores genéticos y se caracteriza por la aparición temprana antes de los 60 años, se presenta del 1% - 5% del total de casos patológicos. Mientras que la forma esporádica es la más frecuente, se presenta en el 95% de los casos y la etiología aún es desconocida pero tiene implicaciones epigenéticas y se caracteriza por la aparición después de los 60 años (Chouraki y Seshadri, 2014; Reitz y Mayeux, 2014).

La EA fue descrita hace más de 100 años (Fargo y Bleiler, 2014), por el médico alemán Aloysius Alzheimer quien especificó en 1906, en un reporte, los cambios histomorfológicos en el cerebro de su paciente Auguste Deter de 51 años, quien presentó un raro caso de enfermedad psiquiátrica (Strassnig y Ganguli, 2005). Estas alteraciones morfológicas fueron descritas como placas neuríticas formadas por el péptido β A y la agregación de marañas neurofibrilares (MNF) compuestas por la proteína tau hiperfosforilada (Fig. 1A).

De manera macroscópica, existe atrofia simétrica y difusa en los giros cerebrales (lóbulos temporales, parietales y occipitales), los surcos presentan mayor profundidad y los ventrículos se encuentran dilatados 13(Llibre Rodríguez y

Guerra Hernández, 2002) (Fig.1B). De manera microscópica las alteraciones observadas están asociados a diversas regiones del cerebro como la corteza cerebral, corteza entorrinal, hipocampo, estriado ventral y cerebro anterior basal, estas alteraciones son la formación de placas βA , formación de marañas neurofibrilares (MNFs) causadas por la hiperfosforilación y truncamiento de la proteína *tau*, pérdida sináptica, muerte neuronal, estrés oxidativo, astrogliosis y activación de microglía la cual produce inflamación (Barrow y Small, 2007; Desai *et al.*, 2009; Hardy y Selkoe, 2002). A partir de múltiples estudios realizados para descubrir la etiopatología de la EA, surge una nueva teoría denominada como “hipótesis de la cascada amiloide” propuesta por Hardy y Higgins en 1992 en la que asumen que la deposición de la proteína βA en forma de placas, es el agente causal y principal disparador de otros elementos de la patología como la pérdida neuronal, el daño vascular y las alteraciones de la proteína *tau* que promueven la neurodegeneración (Hardy y Higgins, 1992; Hardy y Selkoe, 2002).

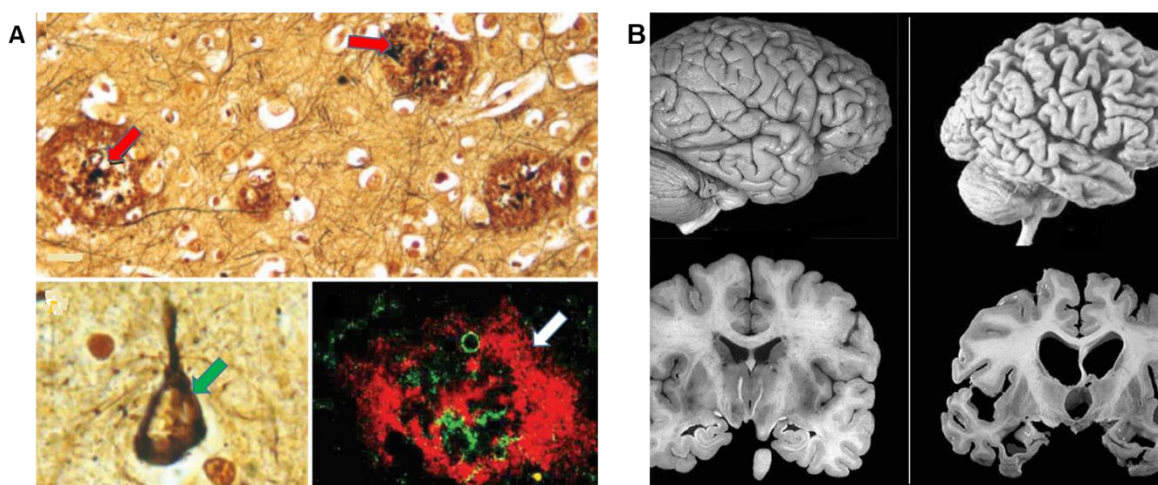


Figura 1. Lesiones histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro. En A, se observan las placas βA amorfas con neuritas distróficas (flechas rojas), abajo, las marañas neurofibrilares (flecha verde) de una neurona y en la imagen con inmunofluorescencia (flecha blanca), se indica una placa βA en rojo y en verde microglía. En B, imágenes de un cerebro con alteraciones macroscópicas de un paciente con EA a la derecha y a la izquierda un cerebro de un paciente sin alteraciones neurodegenerativas (Tomado de O'Brien y Wong, 2011).

Péptido β A

El péptido β A es un metabolito soluble de 4kDa, el cual es generado mediante el metabolismo de la proteína precursora amiloide (APP). En condiciones normales se ha visto que la APP tiene funciones importantes como en estadios tempranos de desarrollo donde se encarga de decidir el destino neuronal, hasta el establecimiento de sinapsis funcionales y el mantenimiento de la arquitectura neuronal (Nicolas y Hassan, 2014). El metabolismo proteolítico de la APP se produce a través del complejo de las enzimas secretasas α , β y γ (Hardy y Selkoe, 2002).

Hay dos vías de procesamiento para la APP, la vía no amiloidogénica y la amiloidogénica; la primera, es llevada a cabo por la α y γ -secretasa y la segunda, por la escisión de la β y γ secretasas (Montoliu-Gaya y Villegas, 2015) (Fig.2A-B). Las formas de β A más comunes presentes en la EA, están conformadas por 40 (β A₄₀) y 42 (β A₄₂) residuos aminoacídicos, siendo β A₄₂ la más abundante en condiciones patológicas debido a que tiende a agregarse con mayor facilidad (Karran *et al.*, 2011; Walsh y Selkoe, 2007).

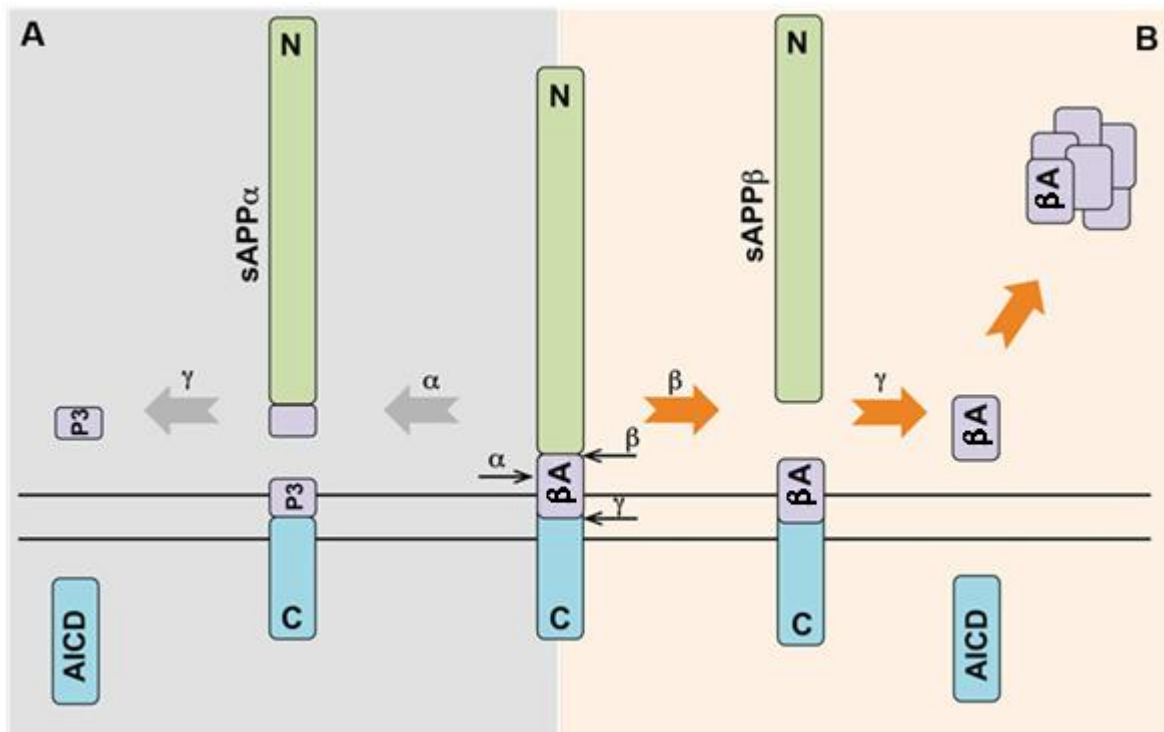


Figura 2. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide, APP. En A, La vía no amiloidogénica (normal) por la escisión de la APP mediante la enzima α -secretasa que inicia el

procesamiento no amiloide seguido del corte de la γ secretasa. En **B**, El procesamiento anormal, amiloidogénico de la APP que implica la escisión mediada por la β -secretasa seguido por el de la γ -secretasa Modificado de Nicolas y Hassan, 2014.

La forma de placa es la última versión de los agregados β A, ya que también se pueden encontrar en monómeros, fibrillas, protofibras, ligandos difusibles derivados de β A (LDD β As) y oligómeros solubles. Siendo los oligómeros solubles considerados la especie más tóxica y causante de la amiloidosis en la EA (Miller *et al.*, 2010). En un trabajo de Lei y colaboradores (2016), se demostró que los oligómeros de β A eran los responsables de la excitotoxicidad causada por un aumento de glutamato dado por la falla en la recaptura y también por una disminución del tono GABAérgico. De la misma manera Busche y colaboradores (2008) encontraron que al administrar localmente diazepam y benzodiacepinas en ratones doble transgénico APP23XPS45, los efectos de hiperactividad neuronal dados por β A se reducen, ya que aumentan la probabilidad de apertura de los canales ionotrópicos del receptor GABAérgico.

Alzheimer y GABA

La regulación de la excitabilidad neuronal es importante para las funciones del cerebro, un aspecto fundamental de la función sináptica es la co-activación de neuronas excitatorias e inhibitorias. Una alteración en cualquiera de estos sistemas, puede desencadenar cambios en funciones cognitivas y motoras.

Con estudios inmunocitoquímicos se ha demostrado la disminución de terminales perisomáticas GABAérgicas tanto en pacientes con EA, como en ratones transgénicos APP/PS1, especialmente en neuronas corticales adyacentes a las placas β A (Li *et al.*, 2016).

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de los mamíferos, fue descubierto en 1950 por Roberts y Awapara (Spiering, 2018). Su síntesis se lleva a cabo a través de la descarboxilación de glutamato catalizado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD); existen dos isoformas de GAD codificadas por dos genes diferentes, GAD_2 (GAD^{65}) y GAD_1 (GAD^{67}), estas dos

isoformas presentan diferencias en cuanto a la localización celular, la función, las propiedades reguladoras y las interacciones de cofactores (Buddhala *et al.*, 2009). El efecto inhibitorio de GABA se estimula a través de tres tipos distintos de subfamilias de receptores GABA_A, GABA_B y GABA_C. Estos receptores se dividen en ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) y metabotrópicos (GABA_B) (Li *et al.*, 2016). Estudios *post mortem* en pacientes con EA, muestran una disminución de la expresión del receptor GABA_A en regiones corticales (Kiss *et al.*, 2016). Por otro lado, el uso de pentobarbital, un fármaco barbitúrico, en ratones *knock in* para apoE4 funciona como un potenciador de la actividad del receptor GABA_A, aumentando el tono inhibitorio y recuperando de manera aguda los déficits de neurogénesis del hipocampo, lo que previene el deterioro de las interneuronas y por lo tanto la pérdida de fenotipos conductuales como el aprendizaje y la memoria (Tong *et al.*, 2016).

Interneuronas GABAérgicas

Como se mencionó al principio la acción y efecto del neurotransmisor GABA es llevado a cabo por las IG. La gran diversidad de IG son clasificadas de acuerdo a las propiedades moleculares del neurotransmisor que sintetizan, que pueden ser proteínas de unión a calcio como calbindina (CB), parvalbumina (PV) y calretinina (CR), o pueden ser neuropéptidos moduladores como somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY), colecistoquinina (CCK), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y óxido nítrico (NO). No todas se expresan en las mismas neuronas y tampoco actúan en el mismo sitio, pero en la mayor parte de los casos pueden llegar a expresarse de manera colocalizada (Kepecs y Fishell, 2014; Maccaferri y Lacaille, 2003; McBain y Fisahn, 2001).

Las neuropatologías como la EA, Huntington, Parkinson y epilepsia del lóbulo temporal, tiene en común la alteración de la transmisión GABAérgica dependiente de SOM (Csaba y Dournaud, 2001). En el trabajo realizado en humanos, por Nilsson y colaboradores (2001), se muestra que los niveles de SOM en el líquido cefalorraquídeo están disminuidos en personas que padecen la EA. En el 2006, Ramos y colaboradores, encontraron una disminución en la densidad de interneuronas SOM y NPY en la región hipocampal (EO y E. *lacunosum-*

moleculare), además de una relación negativa de los niveles de interneuronas SOM y NPY en zonas cerebrales donde aumentan paulatinamente los niveles de β A en dos modelos de ratón transgénico para la EA, uno para PS1 y otro para PS1xAPP. Esta disminución de interneuronas SOM y un aumento de β A tiene sentido, ya que las interneuronas SOM tienen participación sobre la actividad de neprilisina, una metaloproteasa que se encarga de degradar al péptido β A de forma natural; esto fue demostrado en cultivos celulares tratados con β A por Saito y colaboradores (2005), en donde al administrar somatostatina la actividad de neprilisina aumenta y los niveles de β A disminuyen.

Somatostatina

La SOM es un tetradecapéptido cíclico ampliamente expresado por una variedad de sistemas como el nervioso, el inmune y el circulatorio, así como en el tracto gastrointestinal y páncreas (Pawlikowski y Meleń-Mucha, 2004). Este péptido cíclico, fue descubierto en 1973, en el extracto del hipotálamo de oveja (Martin *et al.*, 2007). Se sabe que ejerce un amplio rango de acciones biológicas, que incluyen la inhibición de la hormona del crecimiento, insulina, glucagón y gastrina (Epelbaum *et al.*, 2009). En el cerebro, la SOM actúa como un neuropéptido modulador e inhibidor que colocaliza con GABA (Lin y Sibille, 2013). La SOM se encuentra en dos formas, una de 14 residuos (SOM₁₄) y otra de 28 residuos (SOM₂₈) aminoacídicos, ambas derivan del precursor pre-pro-somatostatina. La SOM₁₄ se produce principalmente en el SNC y en otros órganos periféricos, en cambio la SOM₂₈ se produce en la mucosa de las células epiteliales a lo largo del tracto gastrointestinal (Adriaensen *et al.*, 2009; Tostivint *et al.*, 2008).

La acción biológica de SOM es mediada por un grupo de seis receptores acoplados a proteína G, y los cuales son codificados por cinco genes *sst1-sst5*, el receptor *sst2* se encuentra en dos diferentes variantes *sst2A* y *sst2B* con diferencias en el extremo C-terminal (Jacobs y Schulz, 2008).

En el SNC, las IG SOM se encuentran en altas densidades y dan lugar a una extensa red de fibras y axones terminales en numerosas regiones del cerebro incluyendo la corteza cerebral, hipocampo, amígdala, hipotálamo, en el tronco

encefálico y en la médula espinal (Burgos-Ramos *et al.*, 2008; Csaba y Dournaud, 2001). La SOM se encuentra en dos tipos celulares, interneuronas de proyección larga e interneuronas de proyección corta, que actúan dentro de microcircuitos (Viollet *et al.*, 2008). Las acciones y/o efectos de SOM están implicadas en las funciones motoras, sensoriales, cognitivas y autónomas, dentro de estas diferentes actividades puede actuar de diferente forma como neurohormona, neurotransmisor, neuromodulador, o como factor local que actúa a través de mecanismos autócrinos o parácrinos (Cervia y Bagnoli, 2007).

Glutamato Descarboxilasa

La GAD, es una enzima que cataliza la descarboxilación del glutamato a GABA y CO₂. En mamíferos la GAD existe en dos isoformas de pesos moleculares de 65 y 67kDa, codificados por los genes *GAD₁* y *GAD₂*, en los cromosomas 4 y 10, respectivamente. Estas isoenzimas se asemejan en su estructura primaria, excepto por la heterogeneidad significativa encontrada en los 100 residuos N-terminales, lo que sugiere ciertas diferencias en la localización y función celular.

Ambos genes se expresan en el cerebro cuando el GABA es utilizado como neurotransmisor. Tanto *GAD⁶⁷* como *GAD⁶⁵* son regulados de manera postraducciona por el piridoxal 5'-phosphate (PP), y GAD se activa posteriormente por su vinculación a éste (Chen *et al.*, 2003). La mayor parte de *GAD⁶⁷* está unida a PP en todo momento, mientras que *GAD⁶⁵* se une a PP en eventos donde se necesita GABA para la neurotransmisión.

Por otro lado, la homología entre las enzimas *GAD⁶⁷* y *GAD⁶⁵* es de 71%, especialmente en el cofactor de unión y los dominios C-terminal. La *GAD⁶⁷* es constitutivamente activa y produce más del 90% de GABA en el SNC, además es regulada por la actividad neuronal. Se ha observado una alteración de la actividad inhibitoria en múltiples trastornos neuropsiquiátricos, debido a que los niveles de *GAD⁶⁷* influyen directamente en la modulación de la inhibición sináptica. Por lo tanto, la deficiencia de *GAD⁶⁷* en las neuronas contribuye a la disfunción cortical en estados de enfermedad (Lazarus *et al.*, 2015).

Formación hipocampal

La formación hipocampal (FH) está ubicada dentro del lóbulo temporal medial y es un componente prominente del SNC de los mamíferos, organizado como un circuito unidireccional. La FH está conformada por tres divisiones citoarquitectónicas fundamentales: el giro dentado (GD), el hipocampo y el *subiculum* (Sub) (Witter, 2012) (Fig. 3A). La corteza entorrinal (CE) desarrolla un papel esencial junto a la FH para la ejecución de la navegación espacial y la memoria espacial y episódica. La información en este circuito es transferida de las capas superficiales de la CE al giro dentado, sucesivamente se procesa en el hipocampo y posteriormente es enviada de forma directa a la capa 5 de la CE por la vía CA1-CE o indirectamente por la vía Sub-CE (Roy *et al.*, 2017) (Fig. 3B). El hipocampo es una estructura formada por tres regiones que dan lugar al *cornu Ammonis* (CA1, CA2 y CA3), divididas a su vez en diferentes estratos; *Oriens* (EO), *Pyramidalis* (EP) y *Radiatum* (ER).

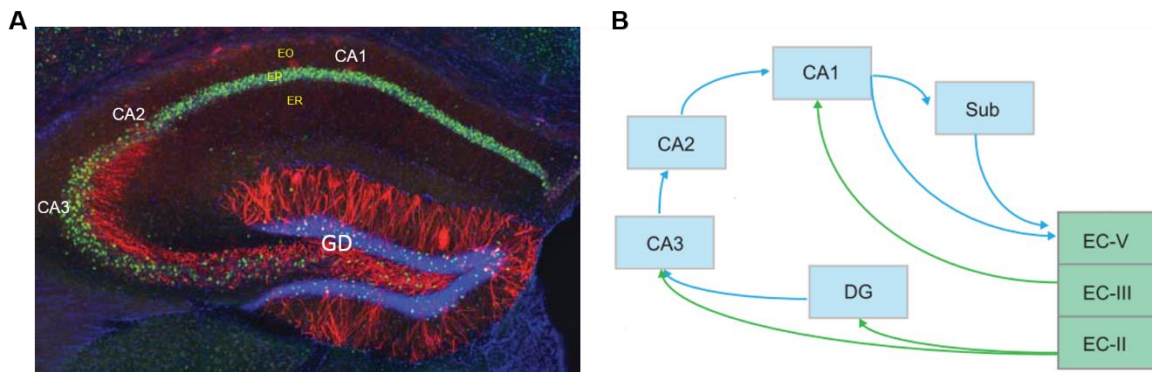


Figura 3. Formación hipocampal. En **A**, imagen de microscopia confocal, indicando los campos CA del 1-3, divididos en los estratos: *Oriens* (EO) *Pyramidalis* (EP) y *Radiatum* (ER) y el giro dentado (GD). En **B**, Diagrama representativo del circuito hipocampal en azul y en verde las capas II, III y V de la corteza entorrinal (EC) (Josselyn y Tonegawa, 2020).

Como se menciona, en la EA la formación hipocampal es una de las estructuras más afectadas, ya que hay muerte neuronal lo que puede ocasionar cambios conductuales y alteraciones cognitivas, debido al daño de una variedad de neuronas, principalmente, las piramidales. Aunado a lo anterior, se sabe que las IG representan del 10-15% de la población dentro de la FH y se han clasificado alrededor de 15 subtipos (Pelkey *et al.*, 2017; Tepper *et al.*, 2018). En el 2012, Loreth y colaboradores, encontraron en el modelo de ratón transgénico TauPS2APP, neurodegeneración de interneuronas GABAérgicas y la disminución de la expresión

de ARN mensajero de marcadores de inhibición sináptica. En otra investigación, se encontró también actividad de descargas epileptiformes espontáneas en un ratón transgénico (hAPP), debido a la disminución de actividad oscilatoria *gamma*, dependiente de las interneuronas (Verret *et al.*, 2012).

Modelo 3xTg-AD

Existe gran variedad de modelos transgénicos para la EA. En general, los modelos de ratón ocupan un nicho remarcable en la investigación de la fisiopatología. Los ratones tienen un alto grado de conservación filogenético en relación con el humano, haciendo énfasis en la arquitectura y función del hipocampo y la CE, que median la memoria espacial y episódica, vulnerables durante el desarrollo de la degeneración progresiva en la EA. A la fecha no se ha desarrollado un modelo que recapitule todos los aspectos de la patología, y se deben reconocer las limitaciones en la aplicación y extrapolación de los datos obtenidos a partir de los modelos animales a los humanos, ya que simulan más estrechamente la EA de tipo genético, o de dominancia autosómica (Hall y Roberson, 2012). Sin embargo, el uso de modelos que imitan la patología de la EA nos permite probar y desarrollar estrategias terapéuticas, así como la investigación del curso de la enfermedad y la fisiopatología (Elder *et al.*, 2010).

Los modelos de ratones transgénicos expresan altos niveles de APP humana y muestran una serie de síntomas y procesos fisiopatológicos típicos de la fase temprana de la enfermedad de Alzheimer. Muchas estrategias terapéuticas contra la EA en humanos, también han sido administradas en modelos transgénicos como Tg2576, APP23, APP/PS1 y 5xFAD. A pesar de esto, el modelo 3xTg-AD probablemente tenga la validez de construcción más alta entre los modelos transgénicos (Bilkei-Gorzo, 2014). El ratón 3xTg-AD fue desarrollado por Oddo y colaboradores (2003), a través de la microinyección de transgenes humanos (APP695-Swe y tau-P301I), en embriones *knock in* para PS1-M146V (**Fig. 4**). Es un modelo que desarrolla progresivamente amiloidosis y taupatía con un perfil específico (temporal y regional), que simula la EA en el humano.

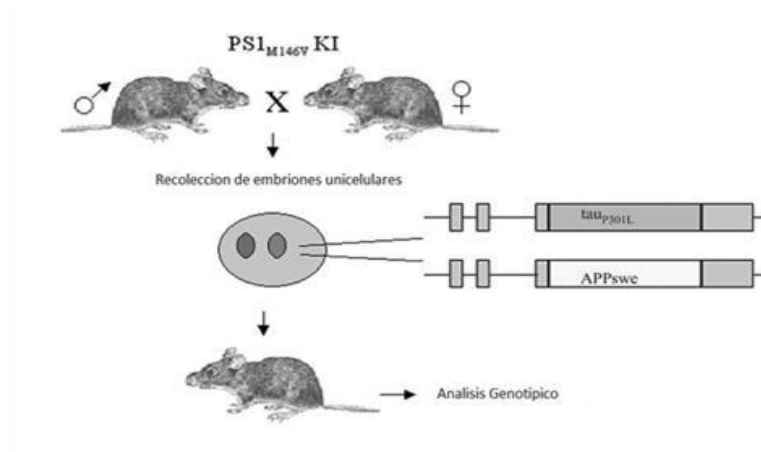


Figura 4. Modelo murino para Alzheimer 3xTg-AD. Método de microinyección de los transgenes humanos APP695-Swe y tau-P301L en el pronúcleo de la célula embrionaria de ratones *knock in* para el gen de PS1-M146V (Oddo *et al.*, 2003).

El modelo 3xTg-AD desarrolla lesiones neuropatológicas que comienzan con la aparición de depósitos del péptido β A en la corteza y posteriormente se acumulan en el Sub y el hipocampo. La detección de los agregados intracelulares es identificable desde los 3 meses en la neocorteza y a los 6 meses en la región de CA1 del hipocampo, mientras que agregados extracelulares son claros a los 12 meses en la corteza e hipocampo. Para el caso de las alteraciones en la proteína tau, su presencia es notoria a los 12 meses en la formación hipocámpal más específicamente en las células piramidales de CA1, ambas patologías se desarrollan de una manera progresiva dependientes de la edad y de la región. Además, este modelo presenta una alteración de la memoria a los 10 meses de edad, comprobada mediante el desempeño de los ratones en tareas conductuales, dependientes de la función hipocámpal como es la del laberinto acuático de Morris (Morin *et al.*, 2016).

Planteamiento del problema

Se ha observado que la alteración de la homeostasis en los sistemas excitación-inhibición cerebrales, puede desencadenar cambios en las funciones cognitivas y motoras, dichas alteraciones se suman en la EA a las lesiones neuropatológicas como la formación de placas del péptido β A y a las MNF, que ocurren en áreas vulnerables del SNC, relacionadas con el aprendizaje y la memoria como son el hipocampo y el Sub. En la actualidad las investigaciones han centrado su interés en el estudio del aumento de los patrones de excitabilidad por falla en la inhibición GABAérgica (Barrow y Small, 2007; Jo *et al.*, 2014), en pacientes con la EA y en modelos animales, debido a esto se postula que la actividad neuronal aberrante puede ocurrir por aumento en la transmisión excitatoria y la disminución inhibitoria de las redes neuronales, lo que podría ser un evento temprano en la EA responsable de la patogénesis. Con base en lo anterior, se propuso el estudio de la caracterización de esta falla, mediante la cuantificación de IG SOM y GAD⁶⁷ en la formación hipocampal del área de CA1 y en el área de Sub del modelo 3xTg-AD, durante el desarrollo de la patología.

Hipótesis

La expresión de IG SOM y GAD⁶⁷ será disminuida en el área CA1 y en el área del *subiculum* de la formación hipocampal del modelo 3xTg-AD.

Objetivos

General

Determinar el número de IG SOM y GAD⁶⁷ en el área de CA1 y en el área del *subiculum* de la formación hipocampal del modelo 3xTg-AD, a los 12 y 18 meses de edad.

Particulares

Cuantificar la cantidad de IG SOM y GAD⁶⁷ en los estratos: *Oriens* (EO), *Pyramidalis* (EP) y *Radiatum* (ER) del área CA1 de la formación hipocampal

Cuantificar la cantidad de IG SOM y GAD⁶⁷ en el área del *subiculum* de la formación hipocampal.

Comparar la cantidad de IG SOM y GAD⁶⁷ en el área de CA1 total y el estrato *Oriens* (EO) de la formación hipocampal entre las edades de 12 y 18 meses.

Comparar la cantidad de IG SOM y GAD⁶⁷ en el área del *subiculum* de la formación hipocampal entre las edades de 12 y 18 meses.

Material Y Métodos

Animales

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y realizados de acuerdo a las políticas internacionales de las directrices institucionales sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Los ratones fueron criados en el bioterio del INB y mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12hrs; se mantuvieron 4 individuos por caja habitación (de policarbonato, 12x12x25 cm), con acceso libre a agua y alimento (dieta Chow 5001). Para los experimentos se utilizaron ratones hembras 3xTg-AD y ratones hembras control no transgénicos (NoTg), de dos edades: 12m (n=4) y 18m (n=8) por grupo.

Procesamiento del tejido

Los ratones fueron anestesiados por administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (0.22ml/kg) y fijados durante 10 minutos por perfusión cardiaca con una solución de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en solución salina amortiguada por fosfatos al 0.1 M (PBS 0.1M) a pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos e inmersos en PFA 4% para una posfijación durante 24 horas, posteriormente fueron cambiados a una solución de sacarosa al 30% por 48-72

horas para asegurar la crio-protección de los tejidos. Los cerebros fueron cortados sagitalmente a 40 µm de grosor utilizando un criostato (Leica® Biosystems).

Anticuerpos y fluorocromos

Para marcar las interneuronas SOM⁺ se usó el anticuerpo anti-somatostatina de conejo (1:500, Santa Cruz Biotechnology sc-13099). Para marcar interneuronas GAD⁶⁷⁺ se usó el anticuerpo anti-GAD67 de ratón (1:500, Abcam ab26116). Para la detección del anticuerpo primario, se usó el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (anti-conejo y anti-ratón, 1:500, Vector Laboratories). Para revelar la inmunofluorescencia se usó el kit de buffer de amplificación de la marca Perkin-Elmer TSA Tetramethylrhodamine (Cy3) para SOM⁺ y TSA Fluorescein (FITC) para GAD⁶⁷⁺. Para revelar la reacción inmuno-enzimática se usó el sistema avidina y biotina (A+B) y diaminobenzidina (DAB) al 0.05%.

Inmunohistoquímica

Se seleccionaron de 3-4 cortes sagitales por animal del hemisferio izquierdo que contenían las áreas de estudio (CA1 y *subiculum*), entre las coordenadas 1.99 mm y 0.96 mm laterales a la línea media de acuerdo al atlas de cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2001). Para los grupos de 12m y 18m los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y al día siguiente con anticuerpos secundarios biotinilados.

Para la inmunohistoquímica enzimática de los grupos de 12 m, se usó como técnica de revelado el sistema A+B y diaminobencidina glucosa oxidasa. Para revelar inmunohistoquímica fluorescente, en el caso de los grupos de 18m, se usó el kit de buffer de amplificación para Cy3 y FITC, respectivamente.

Finalmente, los cortes fueron montados usando una solución de glicina + PBS 50/50 y guardados para su posterior observación.

Microscopia y análisis de imagen

Las imágenes obtenidas fueron de dos campos, la región *subiculum* y CA1 de la formación hipocampal. Para el caso de la inmunofluorescencia las imágenes fueron capturadas en un microscopio confocal (LSM 510 Zeiss), con un plano en z y para las fotos de inmunohistoquímica fueron capturadas en un microscopio óptico (Nikon, Eclipse CiE).

Análisis Estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism 8.3.1 para la aplicación de pruebas estadísticas y la obtención de gráficas. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos. Dado que los datos fueron normales se realizó una prueba T-Test ($\alpha = 0.05$) para comparar la cantidad de células IG-SOM⁺ e IG-GAD⁶⁷⁺ en el área del *subiculum* y en los tres estratos de CA1.

Resultados

Disminución de IG en el 3xTg-AD a los 12 meses

Para determinar si había un cambio en el número de IG en ratones 3xTg-AD con respecto a sus controles NoTg a los 12m, se realizó una inmunohistoquímica (Fig. 5A). Se encontró una reducción en el número de IG SOM⁺ en el área de CA1, principalmente en el EO (Fig. 5B) de ratones 3xTg-AD. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el total de IG SOM⁺ del área de CA1 en los tres estratos (Fig. 5C). Por otro lado, también se contaron las IG del *subiculum* (Sub), donde se encontró una reducción en el número de IG SOM⁺ en el ratón 3xTg-AD (Fig. 5D). En el caso de IG GAD⁶⁷⁺, no se encontró diferencias significativas en la cantidad de interneuronas positivas en los tres estratos, total de IG de CA1, ni en Sub (Fig. 6A-D).

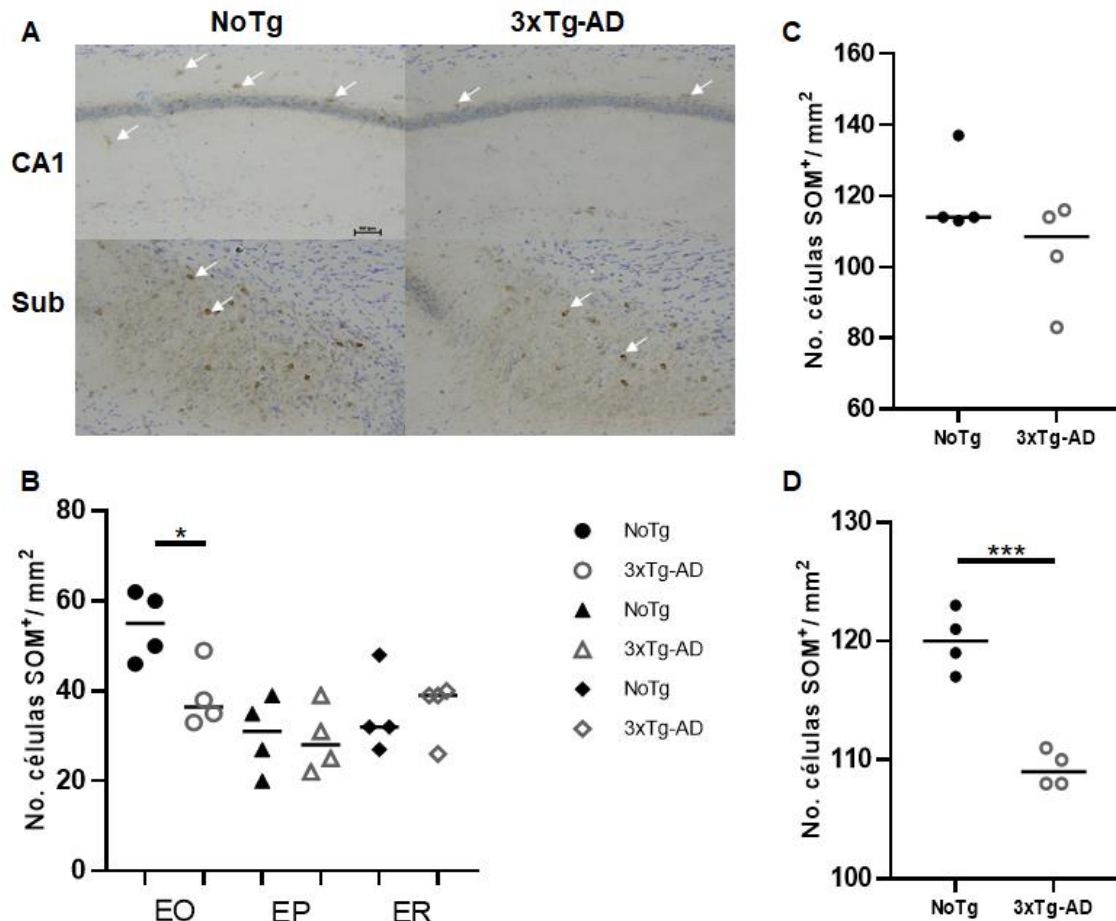


Figura 5. Número de células IG-SOM⁺ a los 12 meses en el ratón 3xTg-AD. . En **A**, imágenes que muestran IG SOM⁺ en al área de CA1 y Sub (flechas blancas). En **B**, gráfica del número de IG SOM⁺ por mm², en donde se indica la disminución significativa en el EO (media $\pm$ EE -15.75 $\pm$ 5.258) en ratones 3xTg-AD. En **C**, el número total de IG SOM⁺ en el CA1 de los tres estratos (EO, EP y ER), en donde no se encontraron diferencias significativas. En **D**, el número total de IG SOM⁺ por mm² en la región de Sub, en donde se muestra una disminución significativa en el ratón 3xTg-AD (media $\pm$ EE -10.75 $\pm$ 1.493). Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando una prueba t-test; con niveles de significancia: *P<0.05 y ***P<0.0005.

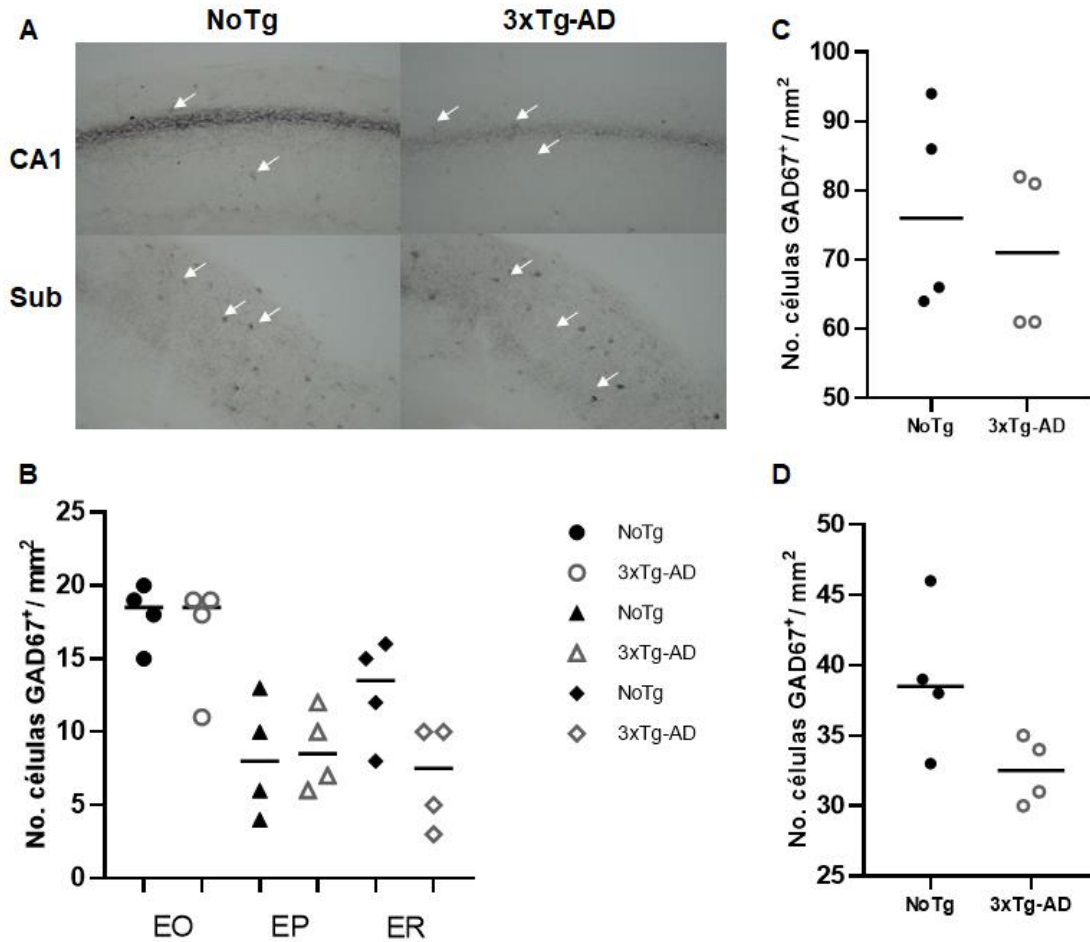


Figura 6. Número de IG-GAD⁶⁷⁺ a los 12 meses en el ratón 3xTg-AD. En **A**, imágenes que muestran IG GAD⁶⁷⁺ en al área de CA1 y Sub (flechas blancas). En **B**, el número total de IG GAD⁶⁷ por mm². En **C**, el número total de IG GAD⁶⁷⁺ en el CA1 de los 3 estratos (EO, EP y ER). En **D**, el número de IG GAD⁶⁷ por mm² en la región del Sub. La comparación estadística se realizó utilizando una prueba t-test. Los datos se representan con la media, siendo estadísticamente no significativos para todos los parámetros evaluados.

El número de IG SOM⁺ decrece a los 18m en el ratón 3xTg-AD

Posteriormente se determinó si la edad influía con el número de IG. Para eso se compararon entre las edades de 12m y 18m (NoTg-12m vs NoTg-18m y 3xTg-AD-12m vs 3xTg-AD-18m). Se encontraron diferencias significativas tanto para IG SOM⁺ (Fig. 9), como para IG GAD⁶⁷⁺ (Fig. 10). Las IG SOM⁺ de los ratones de 18m tuvieron diferencias significativas en el EO, la región CA1 y el Sub, tanto en el grupo control como el grupo 3xTg-AD. Para IG GAD⁶⁷⁺ las diferencias fueron marcadas en EO así como en CA1 en el grupo control, mientras que en el Sub se encontraron diferencias significativas tanto en el control como en el grupo 3xTg-AD.

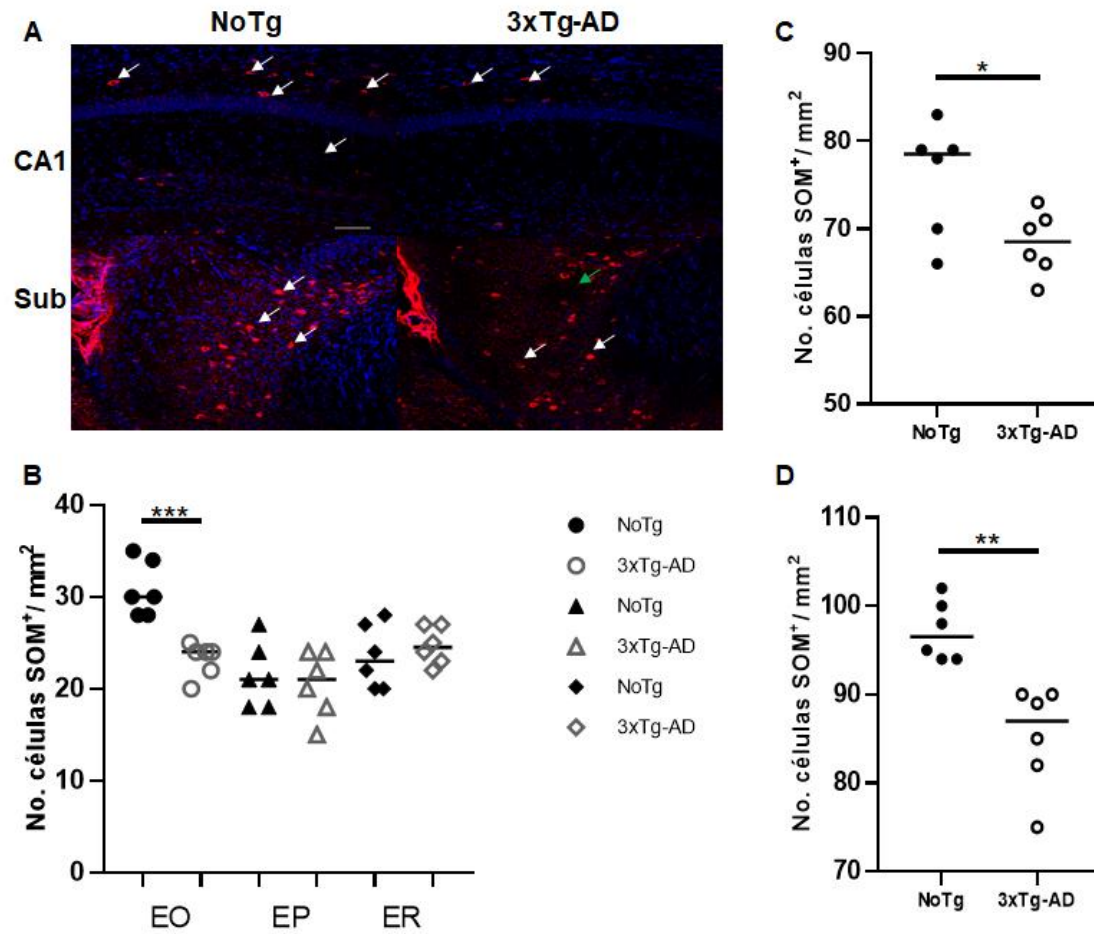


Figura 7. Número de IG-SOM⁺ a los 18 meses en el ratón 3xTg-AD. En **A**, imágenes que muestran IG SOM⁺ en el área de CA1 y Sub (flechas blancas). En **B**, el número de IG SOM⁺ por mm², muestra una disminución significativa en el EO de ratones 3xTg-AD (media $\pm$ EE -7.667 ± 1.434). En **C**, el número total de IG SOM⁺ en los 3 estratos del CA1 (EO, EP y ER), que muestra una disminución significativa en el grupo 3xTg-AD (media $\pm$ EE -7.5 ± 3.023). En **D**, el número de IG SOM⁺ por mm² en la región de Sub, muestra una disminución significativa en los 3xTg-AD con respecto al control media $\pm$ EE -12 ± 2.779). Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando una prueba t-test; *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005.

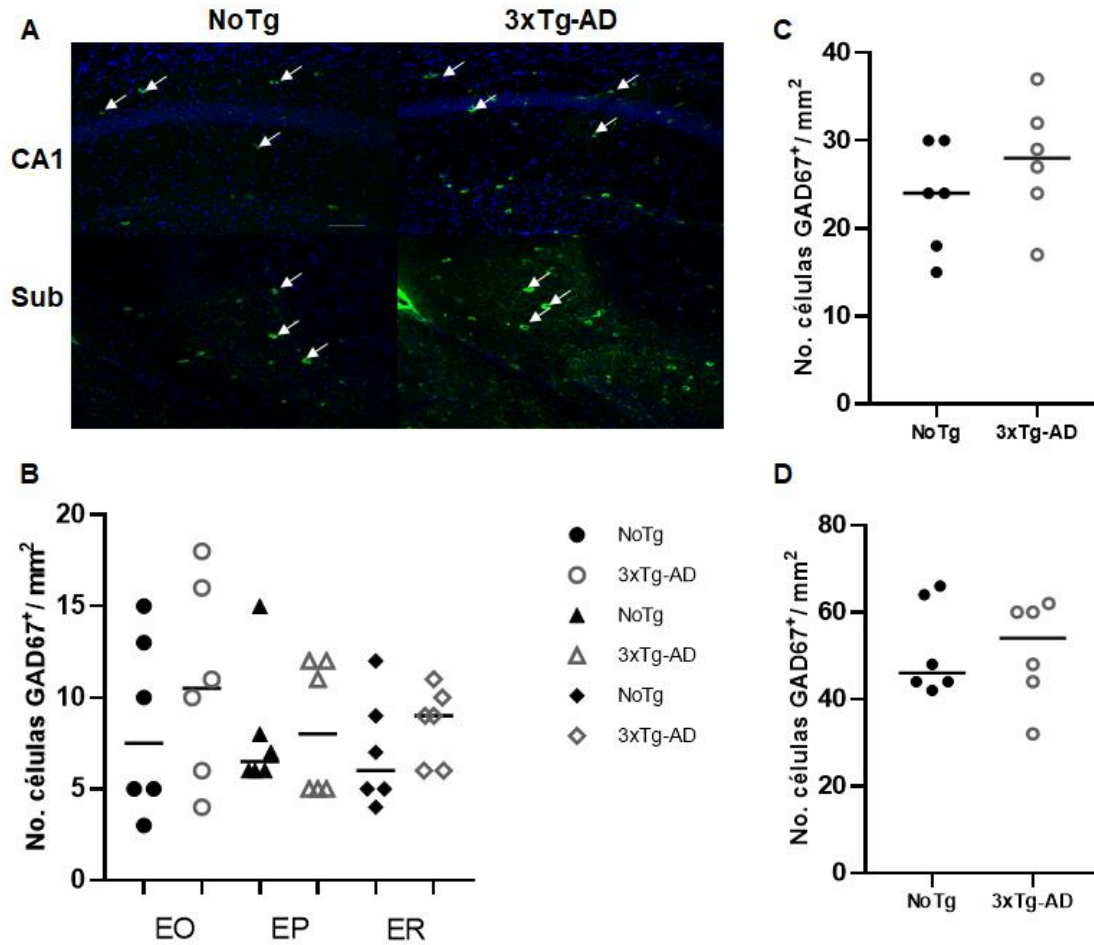


Figura 8. Número de IG-GAD⁶⁷⁺ a los 18 meses en el ratón 3xTg-AD. En **A**, imágenes que muestran IG GAD⁶⁷⁺ en al área de CA1 y Sub (flechas blancas). En **B**, el número de IG GAD⁶⁷⁺ por mm². En **C**, el número total de IG GAD⁶⁷⁺ en el CA1 (EO, EP y ER). En **D**, el número de IG GAD⁶⁷⁺ por mm² en la región del Sub. La comparación estadística se realizó utilizando una prueba t-test. En ninguna de las comparaciones se indicó diferencia significativa. Los datos son representados con la media, siendo estadísticamente no significativos para todos los parámetros evaluados.

IG SOM⁺ e IG GAD⁶⁷⁺ Disminuyen con la edad

Posteriormente se determinó si la edad influía con el número de IG. Para eso se compararon las edades de 12m y 18m (NoTg vs NoTg y 3xTg-AD vs 3xTg-AD). Se encontraron diferencias significativas tanto para IG SOM⁺, como para IG GAD⁶⁷⁺ (Fig. 9-10). Para IG SOM⁺ tuvieron diferencias significativas en el EO, el total de IG SOM⁺ de CA1 y Sub, tanto del grupo control como el grupo 3xTg-AD (Fig. 9). Por otro lado, las IG GAD⁶⁷⁺ las diferencias fueron marcadas en EO y en el total de CA1

solo para el grupo control, mientras que en el Sub se encontró diferencias significativas tanto para el grupo control como para el grupo 3xTg-AD (Fig. 10).

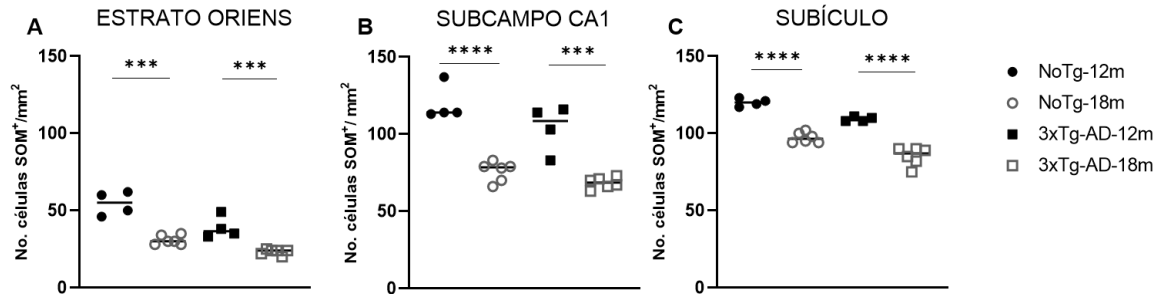


Figura 9. Número de IG SOM⁺ en 12 y 18 meses de edad. Se muestra gráfico del total de IG SOM⁺ del Estrato *Oriens* (EO), el subcampo CA1 y del *subiculum* (Sub). Se indican las comparaciones del número de IG SOM⁺ entre las dos edades y los dos grupos experimentales (NoTg-12m vs NoTg18m y 3xTg-AD-12m vs 3xTg-AD-18m). En **A**, el número de IG SOM⁺ por mm² en el EO, en donde hubo diferencias significativas entre las dos edades (12 vs 18 meses) en cada grupo (NoTg -23.67 ± 3.414 y 3xTg-AD -15.58 ± 2.972). En **B**, se indica el total de IG SOM⁺ por mm² en el CA1, encontrándose diferencias significativas entre las edades (12 vs 18 meses) de ambos grupos (NoTg -43.67 ± 5.663 y 3xTg-AD -35.67 ± 6.264). En **C**, el número de IG SOM⁺ por mm² en el Sub, con reducción significativa a la edad de 18 meses, de ambos grupos (NoTg -22.83 ± 2 y 3xTg-AD -24.08 ± 3.075). Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando una prueba t-test; ***P<0.005, ****P<0.0005.

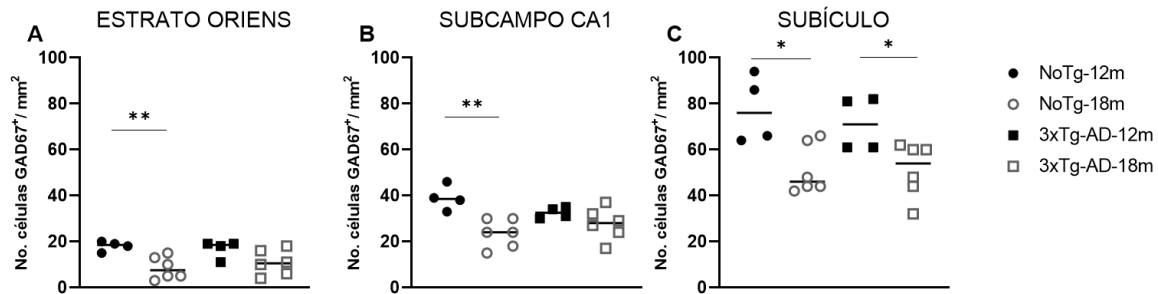


Figura 10. Número de células IG GAD⁶⁷⁺ en 12 y 18 meses de edad. Se muestra gráfico del total de IG GAD⁶⁷⁺ en el Estrato *Oriens* (EO) del subcampo CA1 y de Sub. Se indican las comparaciones del número de IG GAD⁶⁷⁺ entre las dos edades y los dos grupos experimentales (NoTg-12m vs NoTg18m y 3xTg-AD-12m vs 3xTg-AD-18m). En **A**, el número de IG GAD⁶⁷⁺ por mm² en el EO del CA1, en donde hubo diferencias significativas solo en el grupo NoTg (-9.5 ± 2.637). En **B**, el número de IG GAD⁶⁷⁺ por mm² en el total del subcampo CA1, encontrándose reducción significativa en los 18m en el grupo NoTg (-15.5 ± 3.774). En **C**, el número de células GAD⁶⁷⁺ por mm² del Sub, encontrándose reducción significativa en los 18m en ambos grupos NoTg (-26.17 ± 8.037) y 3xTg-AD (-20.25 ± 7.647). Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando una prueba t-test; *P<0.05 y **P<0.005.

Discusión

Las IG, se consideran los elementos celulares principales puesto que controlan la excitabilidad de las neuronas principales en el SNC. Además, no solo contribuyen al equilibrio en actividad de redes corticales, sino, también median de manera precisa la activación de información a través de vías específicas de señalización (Marín Parra, 2012; Kepecs y Fishell, 2014).

En el presente trabajo, se ha diseñado un estudio con base en la relevancia de la alteración en el sistema de neurotransmisión, durante la neurodegeneración de tipo Alzheimer, que provoca un estado de hiperexcitabilidad, con el enfoque en la disminución de las IG SOM⁺ y de las IG GAD⁶⁷⁺, localizadas en dos áreas cerebrales en donde se integra parte de las funciones de memoria, el subcampo CA1 del hipocampo y el Sub. Estas áreas son relevantes porque es donde se inicia el depósito de las proteínas alteradas en su forma de placas y redes neurofibrilares tanto en el cerebro humano como en modelos para la EA.

Los resultados cuantitativos (células/mm²) obtenidos en la investigación muestran una disminución significativa de IG SOM⁺ en el grupo 3xTg-AD a los 12m y 18m (Figs. 5-7) en el EO del subcampo CA1 y en el Sub. Estos datos muestran la vulnerabilidad de las IG SOM⁺ en el modelo, lo que podría ser el paso inicial a la evolución patológica de la EA, debido a que está implicada en la degradación de placas β A (Ramos *et al.*, 2006). Ya que la SOM está involucrada con la actividad de neprilisina, una endopeptidasa con la capacidad de degradar β A en el cerebro, esto fue demostrado en un cultivo primario de neuronas tratadas con β A (β A₄₀ y β A₄₂) y SOM. De hecho, normalmente la SOM regula de manera positiva la actividad de neprilisina transportada a la membrana plasmática (Pacheco-Quinto *et al.*, 2016; Saito *et al.*, 2005). Asimismo, la disminución de IG SOM⁺, encontrada en la fase sintomática de los 3xTg-AD (12m y 18m), induce de manera probable el aumento en los niveles de β A, debido a la disminución de la actividad de la neprilisina, generando un círculo vicioso, debido a la toxicidad de β A sobre las neuronas, incrementando la vulnerabilidad de las IG SOM⁺. Además, el deterioro cognitivo está asociado a la acumulación continua de β A intraneuronal, y la progresión de la patología desde el interior de la neurona hacia la parte extracelular, lo que también

podría explicar en parte la exacerbación del déficit cognitivo, al menos en este modelo de ratón (Billings *et al.*, 2005). También, se sabe de la sinaptopatía asociada por la pérdida de espinas dendríticas (sitios posinápticos) en neuronas piramidales del subcampo del CA1 debido a la proximidad a las placas β A que causa alteraciones de la memoria, demostrado en otros modelos como el Tg2576 y APP/PS1 (Bittner *et al.*, 2012; Perez-Cruz *et al.*, 2011). Si bien, estas alteraciones son evidentes en las neuronas excitatorias, la pérdida de axones y de espinas en las interneuronas, tiene relevancia en procesos de memoria, ya que en un estudio, se demostró en el doble transgénico APP/PS1 un déficit en la memoria por la pérdida de axones y por la disminución de espinas dendríticas en las interneuronas SOM en el hipocampo (Schmid *et al.*, 2016).

Se ha establecido que las regiones del subcampo CA1 y del Sub, representan la salida de información del hipocampo y se ha demostrado que la evocación de memoria es a través de la vía construida por el subcampo CA1, el Sub y la CE (CA1-Sub-CE), mientras que la codificación o almacenamiento de la memoria es mediante la vía CA1-CE (Roy *et al.*, 2017). Se sabe también que la red CE-hipocampo, es de las primeras vías en mostrar alteraciones en las propiedades sinápticas, por lo que se ha sugerido que estas alteraciones subyacen a los déficits de memoria en la EA temprana (Roy *et al.*, 2016). Anatómicamente, en el EO del subcampo CA1 y del Sub, se localizan los somas de estas IG SOM⁺ (Klausberger *et al.*, 2003), por lo que, la pérdida significativa encontrada en el modelo 3xTg-AD podría participar de manera relevante en las alteraciones de la memoria. Esto podría deberse a lo propuesto por estudios que sugieren la participación de SOM a través de la inhibición y la dirección en la formación del número de engramas y la estabilidad de los trazos de la memoria (Stefanelli *et al.*, 2016). Además, se comprobó la participación de las interneuronas SOM en la codificación, consolidación y evocación de la memoria, así como en la reactivación de patrones específicos de actividad neuronal excitatoria en el área prelimbica (Cummings y Clem, 2020). Se sabe por estudios previos en el laboratorio, que la patología del modelo 3xTg-AD se desarrolla de manera progresiva, con una fase asintomática y una sintomática, y se ha encontrado en hembras de 12m de edad un desempeño conductual en el

laberinto acuático de Morris y construcción de nido deficientes (Orta-Salazar *et al.*, 2013; Morin *et al.*, 2016).

Por otra parte, los resultados sobre las IG GAD⁶⁷⁺ que no muestran diferencias (Figs. 6-8), puede deberse a que la pérdida o disminución de las IG GAD⁶⁷⁺ está más relacionada con la esquizofrenia en donde las neuronas GABAérgicas en el hipocampo y la corteza, están sujetas a cambios fisiopatológicos cuya característica es la disminución del ARNm e inmunoreactividad de GAD (Subburaju *et al.*, 2016).

Por otro lado, los trabajos tempranos centrados en la participación del sistema GABAérgico en la EA mostraron resultados inconsistentes, debido a que mencionan que las IG no son vulnerables a los agregados β A. No obstante, trabajos direccionados hacia los receptores GABA_A, muestran una disminución del ARNm. Así también, por análisis de proporción de subunidades del receptor GABA se revela una baja regulación en las subunidades $\alpha 1$ y $\gamma 2$ en la EA (Limon *et al.*, 2012; Kiss *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2020).

Conclusión

Nuestros resultados muestran una disminución de las IG SOM⁺ en el modelo 3xTg-AD en áreas de CA1 y Sub asociadas con la memoria y el aprendizaje a los 12m y 18m. Mientras que en los ratones NoTg solo se vio una diferencia relacionada con la edad, lo que nos muestra que con el avance de la edad hay pérdida de las interneuronas SOM⁺. En cambio, para los ratones 3xTg-AD esta pérdida es determinada por su condición transgénica, por lo que la caracterización sobre las IG SOM e IG Gad⁶⁷ en el modelo 3xTg-AD es importante, pues la EA es multifactorial y el fortalecimiento de los modelos nos ayudará a comprender mejor los mecanismos que participan en el establecimiento de la misma, y a desarrollar terapias eficaces para su tratamiento. Nosotros proponemos un estudio más centrado en las IG SOM sobre el mecanismo y la función de la memoria y el aprendizaje en las áreas CA1 y Sub.

Bibliografía

- Adriaensen, D., Van Nassauw, L., Timmermans, J.-P., & others. (2009). The role (s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review. *Regulatory Peptides*, 156(1–3), 1–8.
- Barrow, C. J., & Small, D. H. (2007). Abeta Peptide and Alzheimer's Disease. *Springer*.
- Bilkei-Gorzo, A. (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(2), 244–257.
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5), 675–688.
- Bittner, T., Burgold, S., Dorostkar, M. M., Fuhrmann, M., Wegenast-Braun, B. M., Schmidt, B., Kretzschmar, H., & Herms, J. (2012). Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathologica*, 124(6), 797–807.
- Buddhala, C., Hsu, C.-C., & Wu, J.-Y. (2009). A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochemistry International*, 55(1), 9–12.
- Burgos-Ramos, E., Hervás-Aguilar, A., Aguado-Llera, D., Puebla-Jiménez, L., Hernández-Pinto, A. M., Barrios, V., & Arilla-Ferreiro, E. (2008). Somatostatin and Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1–2), 104–111.
- Busche, M. A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., & Garaschuk, O. (2008). *Model of Alzheimer's Disease*. September, 1686–1689.
- Calcul, L., Zhang, B., Jinwal, U. K., Dickey, C. A., & Baker, B. J. (2012). Natural products as a rich source of tau-targeting drugs for Alzheimer's disease. *Future Medicinal Chemistry*, 4(13), 1751–1761.
- Cervia, D., & Bagnoli, P. (2007). An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(2), 322–341.
- Chen, C.-H., Battaglioli, G., Martin, D. L., Hobart, S. A., & Colón, W. (2003). Distinctive interactions in the holoenzyme formation for two isoforms of glutamate decarboxylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1645(1), 63–71.
- Chouraki, V., & Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. In *Advances in genetics* (Vol. 87, pp. 245–294). Elsevier.
- Csaba, Z., & Dournaud, P. (2001). Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*, 35(1), 1–23.
- Cummings, K. A., & Clem, R. L. (2020). Prefrontal somatostatin interneurons

- encode fear memory. *Nature Neuroscience*, 23(1), 61–74.
- Desai, M. K., Sudol, K. L., Janelins, M. C., Mastrangelo, M. A., Frazer, M. E., & Bowers, W. J. (2009). Triple-transgenic Alzheimer's disease mice exhibit region-specific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia*, 57(1), 54–65.
- Elder, G. A., Gama Sosa, M. A., & De Gasperi, R. (2010). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), 69–81.
- Epelbaum, J., Guillou, J.-L., Gastambide, F., Hoyer, D., Duron, E., & Viollet, C. (2009). Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: an old story coming of age? *Progress in Neurobiology*, 89(2), 153–161.
- Fargo, K., & Bleiler, L. (2014). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 10(2), 147–192.
- Fuhrer, T. E., Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Synek, B. J. L., Turner, C., Faull, R. L., & Kwakowsky, A. (2017). Impaired expression of GABA transporters in the human Alzheimer's disease hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus. *Neuroscience*, 351, 108–118.
- Gutierrez-Robledo, L. M., & Arrieta-Cruz, I. (2015). Dementia in Mexico: The need for a national Alzheimer's plan. *Gac Med Mex*, 151, 667–673.
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 88(1), 3–12.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–186.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356.
- Hijazi, S., Heistek, T. S., Scheltens, P., Neumann, U., Shimshek, D. R., Mansvelder, H. D., Smit, A. B., & van Kesteren, R. E. (2019). Early restoration of parvalbumin interneuron activity prevents memory loss and network hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 1–19.
- Jacobs, S., & Schulz, S. (2008). Intracellular trafficking of somatostatin receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1–2), 58–62.
- Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y. J., Chun, Y. E., Park, M., Woo, D. H., Bae, J. Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., & others. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 20(8), 886–896.
- Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, 367(6473).

- Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9), 698–712.
- Kepecs, A., & Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature*, 505(7483), 318–326.
- Kiss, E., Gorgas, K., Schlicksupp, A., Gross, D., Kins, S., Kirsch, J., & Kuhse, J. (2016). Biphasic alteration of the inhibitory synapse scaffold protein gephyrin in early and late stages of an Alzheimer disease model. *The American Journal of Pathology*, 186(9), 2279–2291.
- Klausberger, T., Magill, P. J., Márton, L. F., Roberts, J. D. B., Cobden, P. M., Buzsáki, G., & Somogyi, P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature*, 421(6925), 844–848.
- Lazarus, M. S., Krishnan, K., & Huang, Z. J. (2015). GAD67 deficiency in parvalbumin interneurons produces deficits in inhibitory transmission and network disinhibition in mouse prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 25(5), 1290–1296.
- Lei, M., Xu, H., Li, Z., Wang, Z., O'Malley, T. T., Zhang, D., Walsh, D. M., Xu, P., Selkoe, D. J., & Li, S. (2016). Soluble A β oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance. *Neurobiology of Disease*, 85, 111–121.
- Li, Y., Sun, H., Chen, Z., Xu, H., Bu, G., & Zheng, H. (2016). Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 31.
- Limon, A., Reyes-Ruiz, J. M., & Miledi, R. (2012). Loss of functional GABAA receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 10071–10076.
- Lin, L.-C., & Sibille, E. (2013). Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Frontiers in Pharmacology*, 4, 110.
- Llibre Rodríguez, J. de J., & Guerra Hernández, M. (2002). Actualización sobre la enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(4), 264–269.
- Loreth, D., Ozmen, L., Revel, F. G., Knoflach, F., Wetzel, P., Frotscher, M., Metzger, F., & Kretz, O. (2012). Selective degeneration of septal and hippocampal GABAergic neurons in a mouse model of amyloidosis and tauopathy. *Neurobiology of Disease*, 47(1), 1–12.
- Maccaferri, G., & Lacaille, J.-C. (2003). Interneuron diversity series: hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler. *Trends in Neurosciences*, 26(10), 564–571.
- Marín Parra, Ó. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders.

- Martin, R. E., Green, L. G., Guba, W., Kratochwil, N., & Christ, A. (2007). nonpeptide Discovery of the first tetracyclic, small-molecule, highly selective somatostatin receptor subtype 5 antagonists: a chemogenomics approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(25), 6291–6294.
- McBain, C. J., & Fisahn, A. (2001). Interneurons unbound. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(1), 11–23.
- Miller, Y., Ma, B., & Nussinov, R. (2010). Polymorphism in Alzheimer A β amyloid organization reflects conformational selection in a rugged energy landscape. *Chemical Reviews*, 110(8), 4820–4838.
- Montoliu-Gaya, L., & Villegas, S. (2015). Protein structures in Alzheimer's disease: The basis for rationale therapeutic design. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 588, 1–14.
- Morin, J.-P., Cerón-Solano, G., Velázquez-Campos, G., Pacheco-López, G., Bermúdez-Rattoni, F., & Díaz-Cintra, S. (2016). Spatial memory impairment is associated with intraneural amyloid- β immunoreactivity and dysfunctional Arc expression in the hippocampal-CA3 region of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(1), 69–79.
- Nicolas, M., & Hassan, B. A. (2014). Amyloid precursor protein and neural development. *Development*, 141(13), 2543–2548.
- Nilsson, C. L., Brinkmalm, A., Minthon, L., Blennow, K., & Ekman, R. (2001). Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Peptides*, 22(12), 2105–2112.
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185–204.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421.
- Orta-Salazar, E., Feria-Velasco, A., Medina-Aguirre, G. I., & Díaz-Cintra, S. (2013). Morphological analysis of the hippocampal region associated with an innate behaviour task in the transgenic mouse model (3xTg-AD) for Alzheimer disease. *Neurología (English Edition)*, 28(8), 497–502.
- Pacheco-Quinto, J., Eckman, C. B., & Eckman, E. A. (2016). Major amyloid- β degrading enzymes, endothelin-converting enzyme-2 and neprilysin, are expressed by distinct populations of GABAergic interneurons in hippocampus and neocortex. *Neurobiology of Aging*, 48, 83–92.
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2016). Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(12), 777.
- Pawlikowski, M., & Meleń-Mucha, G. (2004). Somatostatin analogs—from new molecules to new applications. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(6), 608–

- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., & McBain, C. J. (2017). Hippocampal GABAergic inhibitory interneurons. *Physiological Reviews*, 97(4), 1619–1747.
- Perez-Cruz, C., Nolte, M. W., van Gaalen, M. M., Rustay, N. R., Termont, A., Tanghe, A., Kirchhoff, F., & Ebert, U. (2011). Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 31(10), 3926–3934.
- Ramos, B., Baglietto-Vargas, D., del Rio, J. C., Moreno-Gonzalez, I., Santa-Maria, C., Jimenez, S., Caballero, C., Lopez-Tellez, J. F., Khan, Z. U., Ruano, D., & others. (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1\APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(11), 1658–1672.
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651.
- Roy, D. S., Arons, A., Mitchell, T. I., Pignatelli, M., Ryan, T. J., & Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, 531(7595), 508–512.
- Roy, D. S., Kitamura, T., Okuyama, T., Ogawa, S. K., Sun, C., Obata, Y., Yoshiki, A., & Tonegawa, S. (2017). Distinct neural circuits for the formation and retrieval of episodic memories. *Cell*, 170(5), 1000–1012.
- Saito, T., Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Takano, J., Huang, S.-M., Suemoto, T., Higuchi, M., & Saido, T. C. (2005). Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nature Medicine*, 11(4), 434–439.
- Schmid, L. C., Mittag, M., Poll, S., Steffen, J., Wagner, J., Geis, H.-R., Schwarz, I., Schmidt, B., Schwarz, M. K., Remy, S., & others. (2016). Dysfunction of somatostatin-positive interneurons associated with memory deficits in an Schmid, L. C., Mittag, M., Poll, S., Steffen, J., Wagner, J., Geis, H.-R., ... others. (2016). Dysfunction of somatostatin-positive interneurons associated with memory de. *Neuron*, 92(1), 114–125.
- Shetty, A. K., & Bates, A. (2016). Potential of GABA-ergic cell therapy for schizophrenia, neuropathic pain, and Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Brain Research*, 1638, 74–87.
- Spiering, M. J. (2018). The discovery of GABA in the brain. *Journal of Biological Chemistry*, 293(49), 19159–19160.
- Stefanelli, T., Bertollini, C., Lüscher, C., Muller, D., & Mendez, P. (2016). Hippocampal somatostatin interneurons control the size of neuronal memory ensembles. *Neuron*, 89(5), 1074–1085.
- Strassnig, M., & Ganguli, M. (2005). About a peculiar disease of the cerebral

- cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry (Edgmont)*, 2(9), 30.
- Subburaju, S., Coleman, A. J., Ruzicka, W. B., & Benes, F. M. (2016). Toward dissecting the etiology of schizophrenia: HDAC1 and DAXX regulate GAD 67 expression in an in vitro hippocampal GABA neuron model. *Translational Psychiatry*, 6(1), e723--e723.
- Tepper, J. M., Koós, T., Ibanez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T. W., & Assous, M. (2018). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons: update 2018. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 91.
- Tong, L. M., Yoon, S. Y., Andrews-Zwilling, Y., Yang, A., Lin, V., Lei, H., & Huang, Y. (2016). Enhancing gaba signaling during middle adulthood prevents age-dependent gabaergic interneuron decline and learning and memory deficits in apoe4 mice. *Journal of Neuroscience*, 36(7), 2316–2322.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3815-15.2016>
- Tostivint, H., Lihmann, I., & Vaudry, H. (2008). New insight into the molecular evolution of the somatostatin family. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1–2), 5–17.
- Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B., Barth, A. M. I., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A. C., Mody, I., & others. (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell*, 149(3), 708–721.
- Villette, V., & Dutar, P. (2017). GABAergic microcircuits in Alzheimer's disease models. *Current Alzheimer Research*, 14(1), 30–39.
- Viollet, C., Lepousez, G., Loudes, C., Videau, C., Simon, A., & Epelbaum, J. (2008). Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1–2), 75–87.
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). Aβ oligomers--a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1172–1184.
- Witter, M. (2012). Hippocampus. In *The mouse nervous system* (pp. 112–139). Elsevier.
- Xu, Y., Zhao, M., Han, Y., & Zhang, H. (2020). GABAergic inhibitory interneuron deficits in Alzheimer's disease: Implications for treatment. *Frontiers in Neuroscience*, 14.