



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA

TESIS DE LICENCIATURA

**Efecto de la administración intramuscular del
fragmento C-terminal de la toxina tetánica a
diferentes dosis sobre la memoria espacial de ratas
con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del
hipocampo**

Que para obtener el título de:
Licenciado en Químico Farmacobiólogo

PRESENTA
pQFB. Patricia Rivera Olivares

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León
Profesor-Investigador
Facultad de Ciencias Químicas-BUAP
Laboratorio de Neurofarmacología

Dra. Aleidy Patricio Martínez
Profesor-Investigador
Facultad de Ciencias Biológicas-BUAP
Laboratorio de Neurofarmacología

JULIO 2022



***A mi madre
A mis hermanos***

***Por ser los pilares de mi vida y
porque este trabajo no solo es mío,
sino también suyo...***

*“Dejamos de temer aquello
que se ha aprendido a entender”*

Marie Curie

*“La ciencia más útil es aquella
cuyo fruto es el más comunicable”*

Leonardo Da Vinci



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias Químicas – BUAP bajo la dirección de

Dr. I. Daniel Limón Pérez de León

y

Dra. Aleidy Patricia Martínez

Agradecimientos institucionales



A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla quién me ha permitido empezar mi formación académica, crecer profesionalmente y emprender este proyecto



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

El fragmento C-terminal de la toxina tetánica fue donado por el Dr. José Aguilera Ávila de la Universitat Autònoma de Barcelona, España



Un agradecimiento especial a cada uno de los animales de laboratorio involucrados en el desarrollo experimental. Seres que aportan tanto al progreso de la investigación en el área de la Salud.

Los animales utilizados para el desarrollo de este proyecto fueron facilitados por el Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a cargo del Dr. Francisco Collazo

A la Comisión Revisora

Mi gratitud y admiración hacia ustedes

Les agradezco por el tiempo dedicado, las observaciones, comentarios y aportaciones invaluableles en el desarrollo del presente proyecto.

Han sido de gran ayuda e inspiración para mi formación profesional.

Dra. Adriana Berenice Silva Gómez

Dra. María Isabel Martínez García

M.C Félix Luna Morales

A mis directores de tesis

Mi gratitud y admiración hacia ustedes

Dr. I. Daniel Limón Pérez de León

Por enseñarme lo básico en clases durante la licenciatura, por despertar en mí la curiosidad y la pasión del conocimiento científico. Por aceptarme en su laboratorio de investigación e introducirme y guiarme en este vasto mundo de las neurociencias. Gracias por creer en mí y en mi capacidad de poder realizar un proyecto como este. Por la paciencia, confianza y exigencia que me permitió mejorar cada día, por demostrarnos que siempre se puede mejorar más que ayer, y que debemos tener presente que “está bien, pero no es suficiente...”

Dra. Aleidy Patricio Martínez

Por todas las enseñanzas cuando inicié en este corto camino de la ciencia. Por la paciencia, tiempo, dedicación, perseverancia y su conocimiento brindado para realizar este proyecto. Por aceptarme y asesorarme como su alumna en el laboratorio. Gracias por la confianza y por sembrar en mí esa disciplina para poder lograr un objetivo. Por enseñarme que mi verdadera competencia soy yo e inspirarme a seguir el camino de la ciencia. Gracias por creer en mí y verme crecer profesionalmente.

Gracias a ambos por su apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. José Aguilera,

Por colaborar y donar el fragmento Hc-TeTx. Muchas gracias por el tiempo que se tomó para hablar sobre el proyecto durante sus visitas a Puebla, por sus comentarios, sugerencias y aportaciones invaluableles. Por compartir su conocimiento sobre Hc-TeTx.

Agradecimientos especiales

A **Leticia Olivares**, mami gracias por tu confianza y apoyo incondicional, por tu ejemplo de fortaleza y voluntad, por las angustias y ausencias que te hice pasar. Por creer siempre en mí. Por TODO. Este trabajo también te pertenece.

A **Jorge Luis y Jesús Eduardo RO**, mis compañeritos incondicionales, por el apoyo y las fuerzas cuando más lo necesitaba, por las desveladas y por escucharme siempre “hablar de ciencia”. Por ver siempre lo mejor de mí. En este trabajo ustedes siempre se hicieron presentes.

A **Memo**, gracias por acompañarnos y darnos ese apoyo incondicional a mi mami, hermanos y a mí durante este tiempo. Por siempre decirme “¿cómo no vas a poder? Si puedes”

A **Lili**, mejor amiga gracias por tus ánimos y visitas cuándo sentía que ya no podía.

A **Brenda J.**, por acompañarme con tu amistad y compartir grandes momentos en este trayecto largo de la licenciatura.

A **Sonia**, amix gracias por todo tu apoyo tanto personal y académico, por ese gran susto que nos llevamos, por tu amistad.

A **Mel y Oli**, por esas charlas académicas y amenas, por su amistad.

A **mis perrunos**, por acompañarme en las noches de desvelo.

A mis compañeros del laboratorio de Neurofarmacología con los que inicié mi estancia: **Dra. Victoria, Eleazar, Felipe, Ana Silvia, Oli, Gris, Leslie, Claudia, Diana, Grego y Janeth** gracias por compartir su conocimiento y consejos. De ustedes aprendí mucho.

A mis compañeros del laboratorio actuales y no tan actuales: **Berenice, Sonia, Nayeli, Isael, David, Melanie, Alan, Andrea y José Crisanto** gracias por su apoyo en los experimentos e interés hacia el trabajo, con ustedes aprendí del trabajo en equipo.

Una mención especial para **Alan**, gracias por ayudarme con el proceso final que por cuestiones de COVID-19 no se pudieron finalizar e integrar aquí, pero fue un gran trabajo, por tu entusiasmo e interés de aprender más.

A los nuevos compañeros que inician a formar parte de este gran grupo de trabajo, gracias por sus comentarios acertados e interés en los seminarios a través de zoom.

Que este escrito sea de gran utilidad para continuar con la
investigación.

A todos y cada uno de ustedes, ¡muchas gracias!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Origen del fragmento C-terminal de la toxina tetánica	1
1.1.1 Internalización y transporte retrógrado del fragmento C-terminal de la toxina tetánica en el sistema nervioso central	2
1.1.2 El papel del fragmento Hc-TeTx en el sistema nervioso central	5
1.2 El péptido Amiloide- β en la enfermedad de Alzheimer	8
1.2.1 Péptido A β 25-35: una herramienta experimental para el estudio de la enfermedad de Alzheimer	9
1.3 Procesos de aprendizaje y memoria	11
1.3.1 Aprendizaje	11
1.3.2 Memoria	12
1.3.3 Memoria espacial	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos particulares	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1 Diagrama experimental	16
5.2 Sujetos de experimentación	16
5.3 Preparación de las soluciones administradas	16
5.3.1 Solución del péptido A β 25-35	16
5.3.2 Solución del fragmento Hc-TeTx	17
5.4 Administración intramuscular	17
5.5 Cirugía estereotáxica	18
5.5.1 Localización de la región CA1 del hipocampo	18
5.5.2 Administración bilateral del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo	19
5.6 Laberinto Acuático de Morris	19

5.6.1 Prueba de aprendizaje espacial	20
5.6.2 Prueba de memoria espacial	21
5.7 Pruebas estadísticas	22
5.7.1 Pruebas estadísticas que se aplicaron a los datos de aprendizaje y de memoria	22
6. RESULTADOS	23
6.1 La administración intramuscular de 20 µg/kg y de 40 µg/kg de Hc-TeTx no modifican la latencia al escape en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM	23
6.2 La administración intramuscular de 20 µg/kg y de 40 µg/kg de Hc-TeTx no modifican la trayectoria de navegación ni la distancia recorrida en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM	25
6.3 La administración intramuscular de 20 µg/kg y de 40 µg/kg de Hc-TeTx previene el deterioro de la memoria espacial en ratas lesionadas con el péptido Aβ25-35 en la región CA1 del hipocampo en el LAM	29
6.4 La administración intramuscular de 20 µg/kg y de 40 µg/kg de Hc-TeTx mejora el desempeño de las trayectorias de nado en ratas lesionadas con el péptido Aβ25-35 en la región CA1 del hipocampo durante la prueba de memoria espacial	32
7. DISCUSIÓN	35
8. ESQUEMA HIPOTÉTICO	40
9. CONCLUSIONES	41
10. PERSPECTIVAS	42
11. REFERENCIAS	43
12. ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la toxina tetánica	2
Figura 2. Estructura tridimensional del dominio Hc-TeTx	3
Figura 3. Transporte retrógrado que realiza el fragmento Hc-TeTx	4
Figura 4. Potencial trófico del fragmento Hc-TeTx	5
Figura 5. El fragmento Hc-TeTx disminuye la neurodegeneración en el septum medial	7
Figura 6. Marcadores histopatológicos de la EA en cerebros humanos	8
Figura 7. Estructura del péptido A β 1-42 y péptido A β 25-35	9
Figura 8. Estructura tridimensional del péptido A β 25-35	9
Figura 9. Clasificación de la memoria a largo plazo	13
Figura 10. Esquema de la localización del músculo <i>gastronecmius</i> en la rata	17
Figura 11. Localización del sitio de administración	18
Figura 12. Laberinto acuático de Morris	20
Figura 13. La administración intramuscular de 20 μ g/kg y de 40 μ g/kg de Hc-TeTx no modifican la latencia al escape en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM	24
Figura 14. La administración intramuscular de 20 μ g/kg y de 40 μ g/kg de Hc-TeTx no modifican la distancia recorrida en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM	27
Figura 15. La administración intramuscular de 20 μ g/kg y de 40 μ g/kg de Hc-TeTx no modifican las trayectorias de navegación durante la prueba de aprendizaje espacial	28
Figura 16. La administración intramuscular de 20 μ g/kg y de 40 μ g/kg de Hc-TeTx evita el deterioro de la memoria espacial en ratas lesionadas con el A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo	31
Figura 17. La administración intramuscular de 20 μ g/kg y de 40 μ g/kg de Hc-TeTx mejora el desempeño de las trayectorias de nado en la prueba de memoria espacial en ratas lesionadas con el A β 25-35	33
Figura 18. Esquema hipotético del efecto de la administración intramuscular de las dosis de 20 μ g/kg y de 40 μ g/kg del fragmento Hc-TeTx contra los efectos tóxicos del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo.	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre el efecto neuroprotector del fragmento Hc-TeTx.	7
Tabla 2. Valores de la latencia al escape (s)	24
Tabla 3. Valores de la distancia total recorrida (m)	27

ABREVIACIONES

6-OHDA	6-hidroxipamina	IL-1β	Interleucina-1 β
Akt	Serina treonina cinasa	IL-6	Interleucina-6
ANOVA	Análisis de varianza	LAM	Laberinto acuático de Morris
APP	Proteína precursora amiloide	L-TeTx	Cadena ligera de la toxina tetánica
Aβ	amiloide- β	MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos (mitogen-activated protein kinasa)
Aβ25-35	amiloide- β 25-35	MPP⁺	1-metil-4-fenilpiridinio
BDNF	factor neurotrófico del cerebro (Brain-derived neurotrophic factor)	NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
BHE	Barrera hematoencefálica	NO	Óxido nítrico
DAPI	Diamidino fenilindol	NOS	Enzima de óxido nítrico sintasa
EA	Enfermedad de Alzheimer	NOS	Especies reactivas de nitrógeno
EEM	Error estándar de la media	PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
EP	Enfermedad de Parkinson	PLC-γ	Fosfalipasa C gamma
ERK	Cinasa reguladora de la señal extracelular (extracellular signal-regulated kinase)	ROS	Especies reactivas de oxígeno
GABA	ácido gamma-aminobutírico	TeTx	Toxina tetánica
GFP	Proteína verde fluorescente	Trk	Tirosin cinasa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol	TrkA	Tirosin cinasa A
H-TeTx	Cadena pesada de la toxina tetánica	TrkB	Tirosin cinasa B
Hc-TeTx	Fragmento C-terminal de la toxina tetánica	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
H_N-TeTx	Fragmento N-terminal de la toxina tetánica		
IL-17	Interleucina-17		

RESUMEN

El fragmento C-terminal de la toxina tetánica (Hc-TeTx) es un péptido que ha demostrado poseer actividad trófica al activar vías de señalización de supervivencia y proliferación celular que desencadenan los receptores Tirocin cinasa (Trk). Estudios recientes evidenciaron que la administración local del fragmento Hc-TeTx en ciertas regiones cerebrales para el estudio de los modelos animales de la Enfermedad de Parkinson (EP) y de la Enfermedad de Alzheimer (EA), disminuye la neurodegeneración celular provocada por las sustancias tóxicas que se utilizaron para inducir cada uno de los modelos de estudio. Sin embargo, este fragmento también tiene la capacidad de realizar transporte retrógrado desde la terminal nerviosa de una motoneurona hasta el Sistema Nervioso Central (SNC) al ser administrado periféricamente. El objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto de la administración intramuscular del fragmento Hc-TeTx a diferentes dosis sobre el aprendizaje y la memoria espacial de ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron administradas por vía intramuscular con las dosis de 20 μ g/kg de Hc-TeTx, 40 μ g/kg de Hc-TeTx o SSI, y 24 horas después se les administró el péptido A β 25-35 o SSI de forma bilateral en la región CA1 del hipocampo a través de cirugía estereotáxica. Las conductas de aprendizaje y memoria espacial se evaluaron en el día 10 y 24 post-cirugía respectivamente en el laberinto acuático de Morris. Los resultados mostraron que el aprendizaje espacial no se modificó en ningún grupo experimental, sin embargo, el grupo SSI + A β 25-35 realizó trayectorias de aprendizaje egocéntrico para localizar la plataforma. En la prueba de memoria espacial, se encontró que los grupos de 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 y de 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 tienen un comportamiento similar al del grupo SSI + SSI en los parámetros que se evaluaron, siendo el grupo de 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 con mejor desempeño. En conclusión, el presente trabajo demostró que la administración intramuscular de las dosis de 20 μ g/kg Hc-TeTx y de 40 μ g/kg Hc-TeTx previenen el deterioro de la memoria espacial en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35, sin embargo, es necesario continuar la investigación del efecto potencial neuroprotector del fragmento Hc-TeTx.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen del fragmento C-terminal de la toxina tetánica

La bacteria *Clostridium tetani* es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto y formador de esporas que sintetiza la toxina tetánica (TeTx). Esta neurotoxina es causante de la enfermedad denominada tétanos, condición altamente mortal que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC), caracterizada por una parálisis espástica que consiste en una contracción sostenida de los músculos que se acompaña de dolor en las extremidades, dolor de cabeza, rigidez y espasmos que pueden llegar a paro respiratorio y a la muerte (Farrar, 2000).

La TeTx se sintetiza como una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de ~150 kDa. Esta cadena se activa por hidrólisis de proteasas de la bacteria para obtener dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro. La reducción de este puente disulfuro genera dos cadenas: una cadena ligera (L-TeTx) de 50 kDa y una cadena pesada (H-TeTx) de 100 KDa (Craven y Dawson, 1973; Helting y Zwisler, 1977). Ambas cadenas se pueden subdividir en tres dominios estructurales y funcionalmente diferentes: el dominio L (cadena L-TeTx) que posee actividad neurotóxica modulado por zinc y el dominio H (cadena H-TeTx) que se divide en dos dominios: el dominio de translocación, que forma canales en la bicapa lipídica, y el dominio de unión a gangliósidos, clave en la unión de la membrana celular (Turton *et al.*, 2002) (**Figura 1**).

La TeTx se internaliza en motoneuronas de la placa neuromuscular para posteriormente ser transportada retrógradamente hasta el SNC (Parton *et al.*, 1987; Schiavo *et al.*, 2000). El dominio catalítico (cadena L-TeTx) que actúa como una endopeptidasa dependiente de zinc se dirige a las proteínas SNARE (Soluble NSF-Attachment Proteins Receptor) para realizar una escisión proteolítica en la proteína vesicular VAMP/sinaptobrevina y de esta forma inhibir el anclaje de la vesícula a la membrana sináptica, y por consecuencia, evitar la liberación de los neurotransmisores ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glicina provocando la excitación de las motoneuronas dando como resultado los espasmos tetánicos (Schiavo *et al.*, 1992). Por su parte, la cadena pesada (H-TeTx) consta de dos

fragmentos: el fragmento H_N que se encuentra en el extremo N-terminal (H_N-TeTx) que facilita el movimiento de la cadena L y el fragmento H_C que se encuentra en el extremo C-terminal (H_C-TeTx) que se une específicamente a las zonas no mielinizadas de la membrana plasmática neuronal (Aguilera y Yavin., 1990).

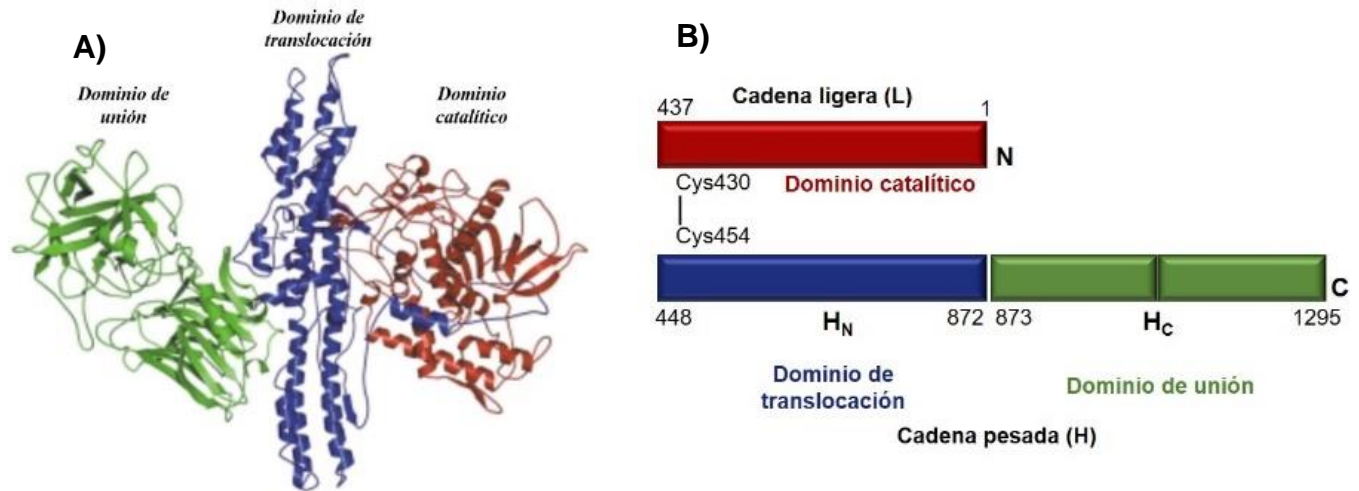


Figura 1. Estructura de la toxina tetánica. A) Estructura tridimensional de la toxina tetánica, posee tres dominios funcionales: de unión, de translocación y catalítico. **B)** La TeTx es sintetizada como una sola cadena sencilla con un peso de 150 kDa, su forma activa está conformado por dos cadenas (cadena ligera de 50 kDa y una cadena pesada de 100 kDa) unidas por un puente disulfuro. Tomado y modificado de Turton *et al.*, 2002.

1.1.1 Internalización y transporte retrógrado del fragmento C-terminal de la toxina tetánica en el sistema nervioso central

La estructura del fragmento C-terminal de la toxina tetánica, denominado ahora H_C-TeTx, se compone de dos subdominios: un dominio en forma de *jelly-roll* semejante a las proteínas con unión a carbohidratos que se conoce como región lectínica y otro dominio denominado β -*trefoil* que presenta dos sitios de unión a gangliósidos, necesarias para la identificación de la célula diana y la internalización (**Figura 2**).

El fragmento H_C-TeTx llega al SNC por transporte axonal retrógrado tras haberse fijado e internalizado en las terminaciones nerviosas motoras, sin efectuar los síntomas clínicos que genera la toxina nativa (Manning *et al.*, 1990).

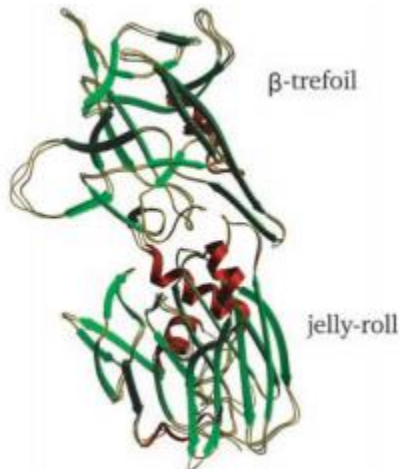


Figura 2. Estructura tridimensional del dominio Hc-TeTx. En la zona N-terminal se encuentra el subdominio compuesto por un motivo *jelly-roll*. En la parte C-terminal está el subdominio constituido por un β -trefoil que posee la unión a gangliósidos. Tomado de Fotinou *et al.*, 2001

El reconocimiento y la unión del fragmento Hc-TeTx se realiza a través de los gangliósidos que se encuentran en las motoneuronas, puesto que es un proceso clave para acceder al interior de la célula. Sin embargo, esta unión también es mediado por dominios lipídicos conocidos como *lipid rafts*, microdominios ricos en esfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Herreros y Schiavo., 2001). Los gangliósidos que poseen dos o más residuos de ácido siálico unidos a galactosa como GD1b, GT1b y GQ1b son altamente específicos para la unión selectiva que posee el fragmento Hc-TeTx (Sinha *et al.*, 2000). Después de la unión y el reconocimiento, el fragmento Hc-TeTx se endocita mediante una vía dependiente de clatrina acoplada a una ruta de transporte retrógrado. Primero transita en vesículas estacionarias para Rab5 y posteriormente en vesículas positivas para Rab7, que pertenecen a la familia de proteínas GTPasas y desempeñan funciones cruciales en la regulación del transporte celular y de factores tróficos. Estos estudios demuestran que el fragmento Hc-TeTx se transporta hacia el SNC junto con el factor neurotrófico del cerebro (BDNF) y sus receptores Tirocin cinasa B (TrkB) y/o p75^{NTR} (**Figura 3A**) (Deinhardt *et al.*, 2006). La velocidad de transporte encontrada para el transporte que realiza el Hc-TeTx oscila de 1.0, 1.5 y 2.1 $\mu\text{m/s}$ (**Figura 3B**) (Lalli y Schiavo., 2002).

Por otra parte, se demostró que una sola administración de la fusión de proteína verde fluorescente (GFP) y el fragmento Hc-TeTx por vía subcutánea en el músculo *levator auris longus*, después de los 5 minutos de la administración, ya se

encontraba en las uniones musculares y, alrededor de las 24 horas, la mayoría de esta proteína estaba internalizada. Cuando se inyectó en el músculo *gastronecmius*, inervado por el nervio ciático, se mostró que el fragmento Hc-TeTx a las 5 horas se encontraba en el nervio y 24 horas después en la medula espinal (**Figura 3C**) (Roux *et al.*, 2005).

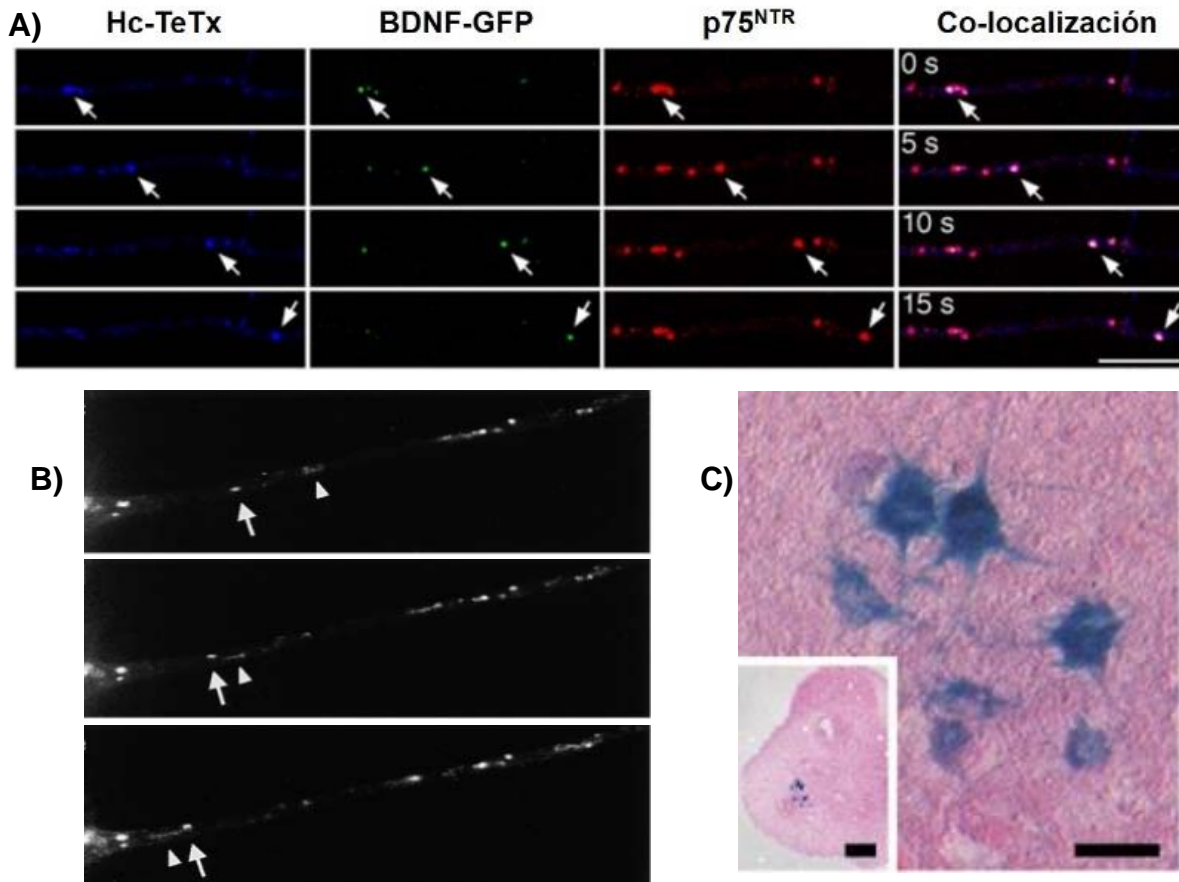


Figura 3. Transporte retrógrado del fragmento Hc-TeTx. **A)** Imágenes individuales de una película de una motoneurona donde se demuestra el transporte de Hc-TeTx junto con BDNF y p75^{NTR} en intervalos de 5 segundos (flechas señalan portadores positivos para cada uno de los marcadores correspondientes). **B)** Imágenes de una magnificación del axón de una motoneurona donde se representa el transporte retrógrado del Hc-TeTx en intervalos de tiempo de 5 segundos por medio de vesículas redondas (flechas blancas) y estructuras tubulares (puntas de flecha) hacia el cuerpo celular. **C)** Detección de β -gal-Hc-TeTx en médula espinal 24 horas después de una administración i.m. del fragmento Hc-TeTx en el músculo *gastronecmius* en ratones. Tomado de Deinhardt *et al.*, 2006; Lalli y Schiavo., 2002; Roux *et al.*, 2005.

1.1.2 El papel funcional del fragmento Hc-TeTx en el sistema nervioso central

Estudios recientes han evidenciado que el fragmento Hc-TeTx no es una simple molécula transportadora, sí no que, por sí mismo posee propiedades neuroprotectoras (Moreno-Igoa *et al.*, 2010) al imitar la acción de las neurotrofinas (Gil *et al.*, 2000, 2001). Además, el uso del fragmento Hc-TeTx tiene la ventaja de poseer la capacidad de unión específica a motoneuronas, internalización y su posterior transporte retrógrado y transináptico (Sinha *et al.*, 2000) hacia el sistema nervioso central, lo cual lo convierte en un agente terapéutico atractivo no invasivo.

Se demostró por medio de estudios *in vitro* que el fragmento Hc-TeTx estimula la fosforilación del receptor Trk que resulta en la activación de las vías PI3K/Akt, PLC- γ y MAPK/ERK (**Figura 4A**) (Gil *et al.*, 2000, 2001; Chaïb-Oukadour *et al.*, 2004), vías involucradas en la supervivencia neuronal. Asimismo, en un estudio realizado por Chaïb-Oukadour *et al.*, en el 2009 se demostró que el fragmento Hc-TeTx tuvo un efecto neuroprotector al evitar la apoptosis inducida por 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) en células granulares cerebelosas sugiriéndolo como una estrategia terapéutica en el tratamiento de enfermedades neurológicas (**Figura 4B**).

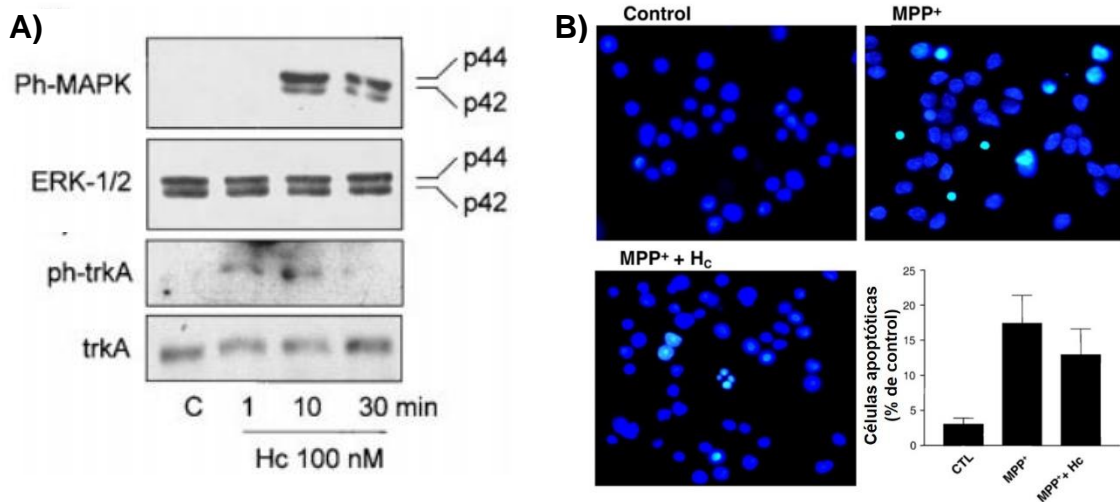


Figura 4. Potencial trófico del fragmento Hc-TeTx **A)** El fragmento Hc-TeTx induce el aumento de la fosforilación del receptor TrkA y de ERK-1/2 después de 10 minutos de incubación a una concentración de 100nM. **B)** El panel de fotomicrografías muestra que el fragmento Hc-TeTx evita la condensación nuclear y la fragmentación típica de apoptosis observadas a través de la tinción nuclear con DAPI (color azul) y mediciones de fluorescencia en cultivos de células granulares cerebelosas tratadas con MPP⁺, el gráfico muestra que el fragmento Hc-TeTx + MPP⁺ disminuye el porcentaje de células apoptóticas. Tomado de Gil *et al.*, 2001 y Chaïb-Oukadour *et al.*, 2009.

Por lo tanto, este efecto protector del fragmento Hc-TeTx también ha sido evaluado en experimentos *in vivo*. En un modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica en ratón, se observó que la administración del fragmento Hc-TeTx en forma de DNA plasmídico mejora la inervación muscular y promueve la supervivencia de las motoneuronas espinales (Miana-Mena *et al.*,2004; Moreno-Igoa *et al.*, 2010). Además, de que en un modelo de la enfermedad de Parkinson se mostró que la administración intraestriatal del fragmento Hc-TeTx previa a la infusión de MPP⁺ mejora las habilidades motoras y aumenta los niveles de dopamina y sus metabolitos de manera similar al grupo control (Mendieta *et al.*,2009). Sin embargo, en estos últimos años se evaluó la administración periférica del fragmento Hc-TeTx, específicamente en el músculo *gastronecmius*, dónde se evidenció que la administración intramuscular por tres días consecutivos de 20 μ g/kg de Hc-TeTx previó a la lesión con 6-hidroxipamina (6-OHDA) disminuye el deterioro motor encontrando un aumento en el número de células positivas a tirosina hidroxilasa y una disminución de argirofilia (Mendieta *et al.*,2012). También se demostró que la administración intramuscular de 20 μ g/kg del fragmento Hc-TeTx nueve días después de la lesión induce un efecto restaurador sobre la neurodegeneración provocada por la toxicidad de 6-OHDA, al promover un aumento en la capacidad de supervivencia celular (Sánchez-González *et al.*,2014).

En nuestro grupo de trabajo, la administración del péptido amiloide- β 25-35 (A β 25-35) en regiones cerebrales de rata como: en corteza temporal, septum medial, la región CA1 del hipocampo, el núcleo magnocelular, la amígdala y el fórnix, se ha utilizado como una herramienta experimental para estudiar algunos mecanismos que se desencadenan en la enfermedad de Alzheimer y, actualmente existen pocos estudios sobre el efecto neuroprotector que tiene el fragmento Hc-TeTx sobre este modelo experimental en rata (**Tabla 1**). Se ha demostrado que la administración del fragmento Hc-TeTx en la región CA1 del hipocampo previo a la administración del péptido A β 25-35 mejora la memoria espacial al disminuir el daño y la muerte neuronal (Netzahualcoyotzi-Piedra., 2009), además, Patricio-Martínez *et al.*, en el 2016 demostraron que la administración del fragmento Hc-TeTx previa a la lesión con el péptido A β 25-35 en el *septum medial* evita la pérdida de la

memoria espacial y a su vez aumenta la expresión de enzimas colinérgicas, al disminuir la neurodegeneración de las células en las vías septo-hipocampal frente a la toxicidad de dicho péptido (**Figura 5**).

Efectos de la administración del fragmento Hc-TeTx en el modelo experimental de rata con la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅			
Sitio de lesión con A β ₂₅₋₃₅	Administración del fragmento Hc-TeTx	Hallazgo	Referencia
Hipocampo (región CA1)	Hipocampo (región CA1) previo al péptido A β ₂₅₋₃₅	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de aprendizaje y memoria espacial Disminuye daño neuronal 	Netzahualcoyotzi-Piedra, 2009
Septum medial Núcleo magnocelular	Septum medial y núcleo magnocelular previo al péptido A β ₂₅₋₃₅	<ul style="list-style-type: none"> Protege el aprendizaje y memoria espacial Mantiene la expresión de enzimas colinérgicas 	Patricio-Martínez, 2012
Septum medial	Septum medial previo al péptido A β ₂₅₋₃₅	<ul style="list-style-type: none"> Previene el deterioro del aprendizaje y memoria espacial Efecto colinotrófico Disminuye daño neuronal 	Patricio-Martínez et al., 2016
Septum medial	Vía intramuscular un día antes de la lesión con el péptido A β ₂₅₋₃₅	<ul style="list-style-type: none"> Evita el deterioro de memoria espacial Mantiene la actividad de acetilcolinesterasa 	Morales-Flores, 2019

Tabla 1. Estudios sobre el efecto neuroprotector del fragmento Hc-TeTx. La tabla muestra los estudios realizados por el grupo del laboratorio de Neurofarmacología FCQ-BUAP con el fragmento Hc-TeTx y la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en diferentes regiones cerebrales de rata para el estudio de ciertos mecanismos que desencadena la enfermedad de Alzheimer.

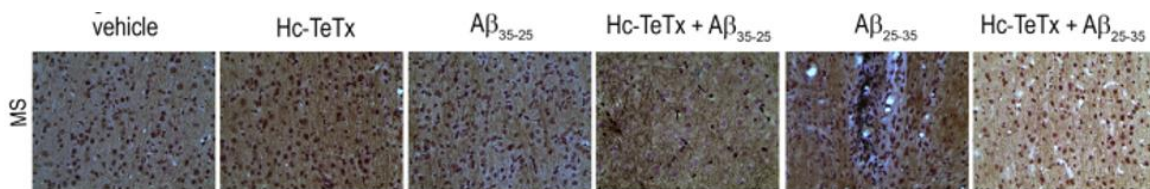


Figura 5. El fragmento Hc-TeTx disminuye la neurodegeneración en el septum medial. El fragmento Hc-TeTx previene el aumento del daño celular inducido por la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ evidenciado con la tinción A-cu-Ag. Tomado de Patricio-Martínez *et al.*, 2016.

Incluso, estos hallazgos sobre el efecto neuroprotector del fragmento Hc-TeTx frente a la toxicidad del péptido A β ₂₅₋₃₅, llevó a nuestro grupo de trabajo a realizar una administración periférica del fragmento Hc-TeTx. Por lo tanto, se demostró que al realizar una sola administración intramuscular a una dosis de 20 μ g/kg de Hc-TeTx, evitó el deterioro de la memoria de tipo espacial al mantener la actividad de la acetilcolinesterasa con respecto al grupo lesionado con el péptido A β ₂₅₋₃₅ en el septum medial (Morales-Flores., 2019).

1.2 El péptido Amiloide- β en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia que afecta aproximadamente un 10% de la población mayor a 65 años. Esta enfermedad se define como un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por un deterioro cognitivo y la expresión dos marcadores histopatológicos: los ovillos neurofibrilares constituidos por la proteína Tau hiperfosforilada y las placas seniles constituidas del péptido amiloide- β (A β) (**Figura 6**) (Butterflied y Kimball., 2018).

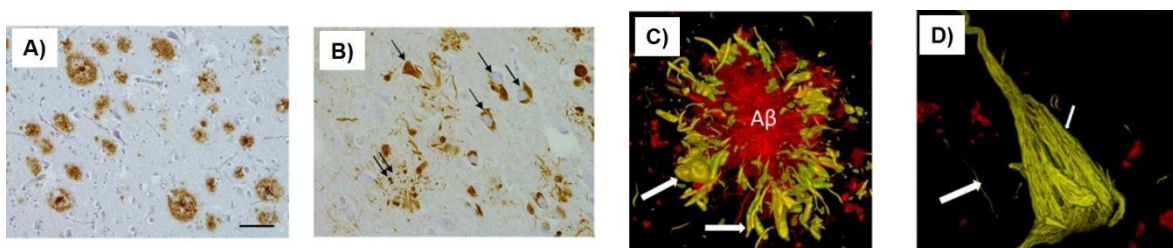


Figura 6. Marcadores histopatológicos de la EA en cerebros humanos. A) Inmunohistoquímica donde se muestran placas Amiloide- β en la región de corteza frontal B) Fotomicrografía que destaca los ovillos neurofibrilares (flechas) compuestas de proteína Tau C) Fotomicrografía tomada por microscopía confocal de una placa fibrilar clásica del péptido amiloide- β D) Maraña neurofibrilar identificada por microscopía confocal. Tomadas y modificadas de Lane et al., 2018 y Luna-Muñoz et al., 2013.

El péptido A β se produce por escisiones proteolíticas específicas de la proteína precursora amiloide (APP) (**Figura 7**), una glicoproteína transmembrana implicada en funciones como: el desarrollo neuronal, la señalización celular, el transporte intracelular y aspectos involucrados de la homeostasis neuronal (Chen et al., 2017; Kirkitadze y Kowalska., 2005). La APP se escinde por dos vías: la vía no amiloidogénica, escindida por α -secretasa y γ -secretasa, y la vía amiloidogénica, escindida por β -secretasa y γ -secretasa. La última vía mencionada genera fragmentos del péptido A β 1-40 o A β 1-42, los cuales cambian su conformación de α -hélice a β -plegada y posteriormente llevan a cabo vías de oligomerización para la formación de las placas insolubles (Sadigh-Eteghad et al., 2015; Kirkitadze y Kowalska., 2005).

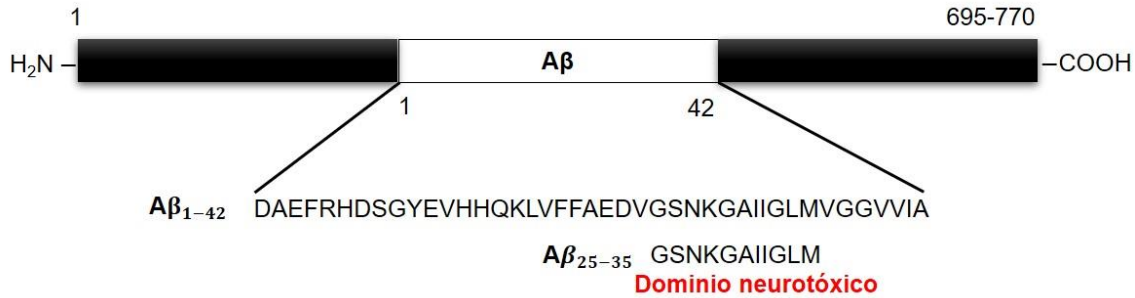


Figura 7. Estructura del péptido A β 1-42 y péptido A β 25-35. Estructura del A β y el dominio neurotóxico que corresponde al péptido A β 25-35, fragmento de 11 aminoácidos. En el proceso de proteólisis de la APP incluye la formación de dos especies de A β : A β 1-40 y A β 1-42. Tomado y modificado de Tran et al., 2002.

1.2.1 Péptido A β 25-35: una herramienta experimental para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Se ha descrito que el péptido A β 1-40 y A β 1-42 son los dos fragmentos predominantes en las placas seniles de pacientes con la EA, sin embargo, otros péptidos como el A β 25-35 también pueden estar presentes (Naldi *et al.*, 2012; Kubo *et al.*, 2002). El péptido A β 25-35 es un fragmento pequeño de 11 aminoácidos (GSNKGAIIGLM) (**Figura 8**) que presenta ciertas características que posee el péptido de longitud completa (A β 1-40 o A β 1-42) como la capacidad de agregarse, por lo tanto, este modelo se ha empleado para estudiar los cambios conformacionales que conllevan a la EA (Wei y Shea., 2006).

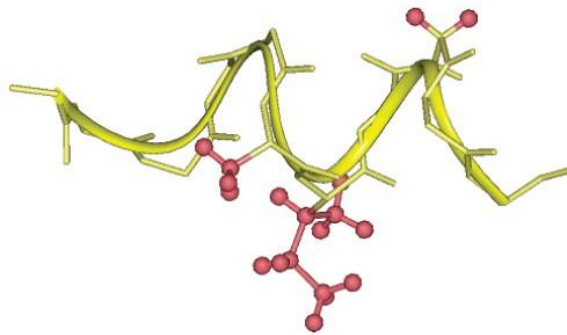


Figura 8. Estructura tridimensional del péptido A β 25-35. Estructura tridimensional del péptido A β 25-35 obtenida por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Los residuos que se afectaron por los giros paramagnéticos se presentan en rojo. Tomado de D'Ursi *et al.*, 2004.

Se ha demostrado que el péptido Aβ25-35 como el péptido Aβ1-42 presenta una transición conformacional de su forma soluble a las formas agregadas de láminas fibrilares (Naldi *et al.*, 2012). Se considera al péptido Aβ25-35 como la región biológicamente activa del péptido Aβ1-40 ya que también confiere propiedades neurotóxicas del péptido completo (Pike *et al.*, 1995). Además, el péptido Aβ25-35 contiene un residuo de metionina en la posición 35, el cual se ha demostrado que es un residuo que juega un papel crítico en los mecanismos de toxicidad (Butterfield y Boyd-Kimball., 2004). En diversos estudios se sugiere que las propiedades neurotóxicas que posee el péptido Aβ25-35 se ejercen a través de mecanismos tóxicos. Uno de los mecanismos del péptido Aβ25-35 es el incremento de la concentración de óxido nítrico (NO) (Stepanichev *et al.*, 2008; Limón *et al.*, 2009) a través de la actividad de la enzima de óxido nítrico sintasa (NOS) dependiente de Ca²⁺, probablemente en consecuencia, de la entrada masiva de Ca²⁺ debido a la sobre activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR). Este proceso de excitotoxicidad favorece el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que participan en el estrés oxidativo y nitrosativo (Harris *et al.*, 1995; Varadajan *et al.*, 2001; Verdier y Penke., 2004). El daño oxidativo en las neuronas provoca el proceso de neuroinflamación que consiste en la activación de células gliales como los astrocitos y la microglía, así como el incremento de citocinas pro-inflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-17 y TNF-α) (Díaz *et al.*, 2011,2012; Ramírez *et al.*, 2018).

Los estudios *in vivo* realizados por el grupo del laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, han demostrado que los mecanismos tóxicos que ocasiona el péptido Aβ25-35 provocan la muerte neuronal en diferentes regiones del cerebro de rata como: el hipocampo, la corteza temporal y el *septum medial* lo cual es evidente con un deterioro cognitivo del aprendizaje y la memoria espacial (Limón *et al.*, 2009; Netzaualcoyotzi-Piedra., 2009; Díaz *et al.*, 2011, 2012; Ortega *et al.*, 2014; Patricio-Martínez *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2018).

De acuerdo con Patricio-Martínez *et al.*, en el 2019 al administrar a ratas 1 μ L a 100 μ M del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo de cada hemisferio hubo neurodegeneración y déficit en la evaluación de aprendizaje y memoria espacial. De manera similar, Ramírez *et al.*, en el 2019 demostraron que la misma concentración de 100 μ M del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo no modifica la adquisición de nueva información (día 6-10), pero si deteriora la capacidad de recuperar dicha información (día 17 y 31). Este déficit cognitivo se asoció con la activación de células gliales que pueden contribuir al daño neuronal. Por lo tanto, estos hallazgos nos indican que el péptido A β 25-35 por medio de sus mecanismos de daño generan una disfunción en el hipocampo y en consecuencia el deterioro en los procesos de aprendizaje y memoria de manera progresiva.

1.3 Procesos de aprendizaje y memoria

El aprendizaje es el proceso por el cual los organismos adquieren conocimientos sobre el ambiente y, consecuentemente modifican su conducta para adaptarse a las condiciones cambiantes del medio que los rodea. En cambio, la memoria es el proceso por el cual los individuos son capaces de almacenar/retener y evocar la información previamente adquirida (Machado, 2008; Morgado, 2005). El aprendizaje y la memoria son dos procesos estrechamente relacionados y susceptibles de sufrir modificaciones en función de los estímulos ambientales. Estos dos procesos se incorporan durante toda la vida, lo cual nos permite prepararnos para una situación de respuesta ante un estímulo anteriormente vivido.

1.3.1 Aprendizaje

El aprendizaje es un proceso que involucra mecanismos perceptivos y asociativos o relacionales que tiene dos formas principales: aprendizaje explícito y aprendizaje implícito. El aprendizaje explícito se relaciona con procesos cognitivos producidas en función del tiempo y que se observa a través del comportamiento; sin embargo, el aprendizaje implícito está relacionado con los procesos motores o el aprendizaje verbal independiente de los procesos cognitivos (Machado, 2008; Morgado, 2005).

1.3.2 Memoria

La memoria no suele formarse instantáneamente cuando se recibe alguna información. El proceso al menos incluye dos etapas: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo consiste en un almacenamiento con una cantidad limitada de información durante un periodo de tiempo corto, es frágil y transitoria que resulta vulnerable a cualquier tipo de interferencias (Morgado, 2005).

En cambio, la memoria a largo plazo es un sistema para el almacenamiento de una gran cantidad de información durante un tiempo indefinido. De esta forma es una memoria estable y duradera con poca vulnerabilidad a interferencias. Requiere de modificaciones post-traduccionales, traducciones de proteínas, expresión de nuevos genes y modificaciones morfológicas. Dentro de la memoria de largo plazo, se encuentra la memoria explícita o declarativa y la memoria implícita o no declarativa.

La memoria de tipo implícito, también denominada “no declarativa” se define como los recuerdos inconscientes que se basan en nuestros hábitos perceptivos y motores. Su expresión es en gran medida automática y difícil de verbalizar. Por su parte, la memoria explícita o declarativa son recuerdos deliberados y conscientes que tenemos sobre el mundo o sobre nuestras experiencias personales. Almacena hechos y eventos autobiográficos; es fácil de declarar verbalmente o por escrito por lo que también se le denomina memoria declarativa (**Figura 9**).



Figura 9. Clasificación de la memoria a largo plazo. Diferentes tipos de memoria a largo plazo: memoria implícita y memoria explícita y cada una de las categorías que la componen. Tomado y modificado de Squire, 2004.

1.3.3 Memoria espacial

La memoria espacial se encuentra clasificada dentro de la memoria episódica (Burgess *et al.*, 2001) y se define como la capacidad de codificar, almacenar y recuperar la información sobre lugares, así como de la capacidad de recordar la ubicación de los objetos en nuestro entorno. Este tipo de memoria consiste en múltiples mecanismos cognitivos que implican la utilización de diversas estructuras cerebrales y mecanismos especializados (Kessels, 2001).

Este tipo de memoria está determinada por la región llamada hipocampo. El hipocampo es importante para la memoria en general, pero puede ser crítico para la memoria espacial (Kessels, 2001). Actualmente existe una gran variedad de estudios que han demostrado que lesiones en el hipocampo llevan a un déficit de la memoria espacial. Se evidenció mediante el registro de potenciales de acción extracelulares del hipocampo de rata expuesta a libre exploración, la actividad de ciertas células que dependen de la ubicación del animal en el entorno y se observó al terminar la tarea, que la actividad de estas células disminuye por completo (O'keeffe & Dostrovsky 1971).

2. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han evidenciado que las neurotrofinas NGF, BDNF y GDNF promueven la supervivencia y la diferenciación neuronal. Sin embargo, estas moléculas no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que deben ser administradas intracranealmente mediante procesos invasivos (Weissmiller y Wu 2012). Debido a esta limitante, se ha optado por la búsqueda de sustancias con efectos semejantes a las neurotrofinas con capacidad de atravesar o evadir la BHE.

Recientemente en el Laboratorio de Neurofarmacología se ha demostrado que el fragmento Hc-TeTx tiene un efecto neuroprotector y neurorestaurador en modelos animales de la EP (Mendieta *et al.*, 2012; Sánchez-González *et al.*, 2014), ya que este fragmento tiene la capacidad de interactuar con los receptores Trk (Gil *et al.*, 2000, 2001; Chaïb-Oukadour *et al.* 2004, 2009). Además, se ha evidenciado que la administración de este fragmento en núcleos colinérgicos como el septum medial (Patricio-Martínez *et al.*, 2016) y en la región CA1 del hipocampo (Netzahualcoyotzi-Piedra, 2009), así como administrado por vía intramuscular en una única dosis de 20 μ g/kg del fragmento Hc-TeTx (Morales-Flores., 2019), previo a la lesión con el péptido A β 25-35 evita el deterioro en la memoria espacial al proteger la actividad de las enzimas colinérgicas y disminuye el proceso inflamatorio producido por los efectos tóxicos del péptido A β 25-35.

Estos hallazgos demuestran una actividad neuroprotectora del fragmento Hc-TeTx en el SNC, pero se desconoce si la actividad neuroprotectora del fragmento Hc-TeTx administrada periféricamente depende de la dosis para causar mejorías ante la toxicidad producida por el péptido A β 25-35. En consideración a esto, se planteó utilizar la capacidad del transporte retrógrado del fragmento Hc-TeTx a través de una administración intramuscular de dos dosis diferentes y posteriormente evaluar el efecto neuroprotector frente a la toxicidad del péptido A β 25-35 en ratas lesionadas en la región CA1 del hipocampo.

3. HIPÓTESIS

La mejora de la memoria espacial depende de la dosis del fragmento C-terminal de la toxina tetánica administrada vía intramuscular en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

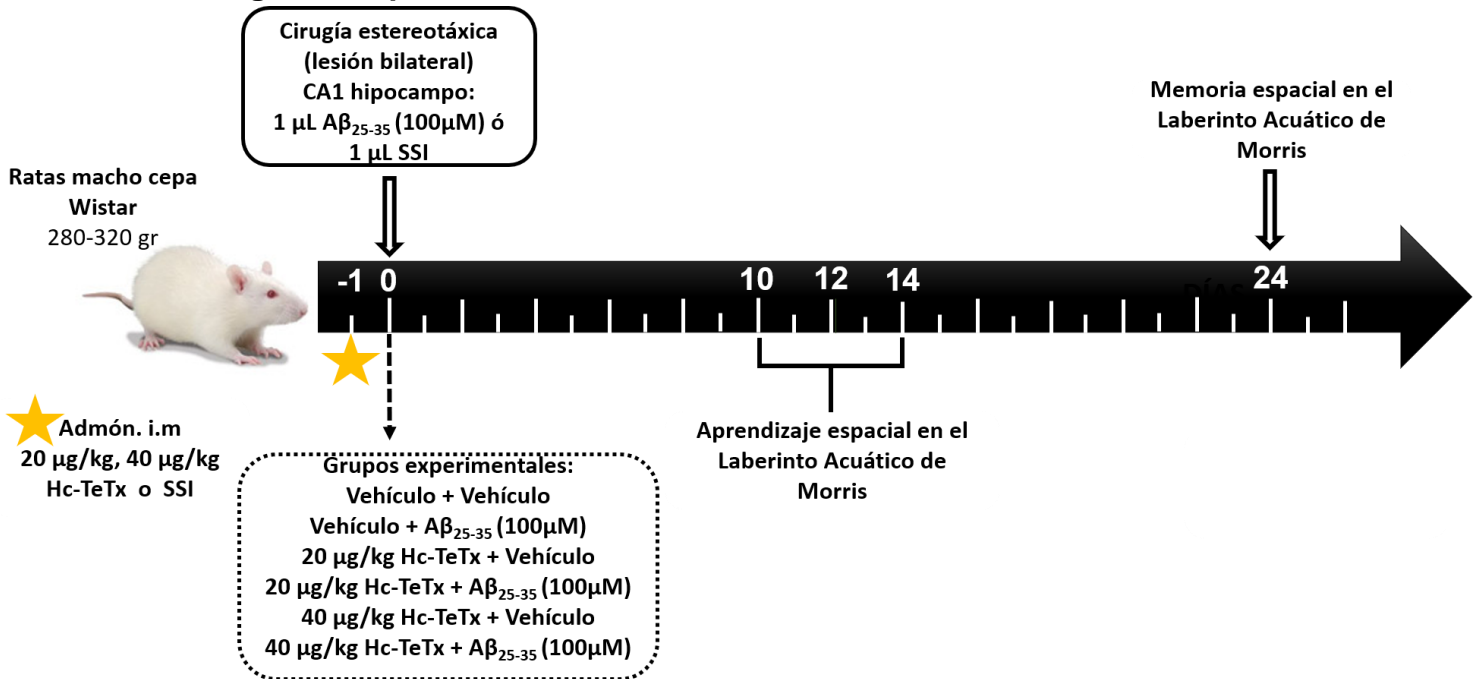
Evaluar el efecto de la administración intramuscular del fragmento C-terminal de la toxina tetánica a diferentes dosis sobre el aprendizaje y la memoria espacial de ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la administración intramuscular del fragmento C-terminal de la toxina tetánica a diferentes dosis sobre el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris de ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo
- Evaluar el efecto de la administración intramuscular del fragmento C-terminal de la toxina tetánica a diferentes dosis sobre la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris de ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama experimental



5.2 Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, de un rango de peso de 270 a 320 gramos. Las ratas se mantuvieron en jaulas de acrílico transparente con agua y alimento *Ad libitum* a una temperatura de 22 ± 2 °C, humedad del 50% y con un ciclo de luz/oscuridad de 12x12 horas. Todos los procedimientos descritos en este trabajo (mantenimiento, cirugía y disección) se realizaron siguiendo los protocolos aprobados por los comités nacionales bajo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 y de la BUAP sobre el manejo y uso de animales de laboratorio.

5.3 Preparación de las soluciones administradas

5.3.1 Solución del péptido A β 25-35

La solución del péptido A β 25-35 se preparó a una concentración de 100 µM a partir de un liofilizado (SIGMA) y fue incubada en un thermoblock (Labnet) a una temperatura de 37°C durante 36 horas para su agregación. El vehículo también fue

tratado bajo las mismas condiciones. Dichas soluciones fueron utilizadas para la administración local en el cerebro de ratas mediante cirugía estereotáxica.

5.3.2 Solución del fragmento Hc-TeTx

La solución del fragmento Hc-TeTx fue preparada a partir de un liofilizado proporcionado por el Dr. José Aguilera del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona, España. El liofilizado se resuspendió en 1 mL de SSI obteniendo una concentración final de 20 μ M. A partir de esta solución madre, se preparó una dilución con una concentración final de 10 μ g/mL.

5.4 Administración intramuscular

La administración intramuscular se realizó un día previo a la cirugía estereotáxica en el músculo *gastronecmius* de ambas extremidades inferiores de la rata (**Figura 10**). Los animales de experimentación fueron divididos al azar en tres grupos experimentales. Al primer grupo experimental se le administró SSI, al segundo grupo se le administró una dosis de 20 μ g/kg de Hc-TeTx y al tercer grupo se le administró una dosis de 40 μ g/kg de Hc-TeTx. El volumen resultante de cada dosis se dividió en dos para ser administrado en cada músculo *gastronecmius* de cada animal.

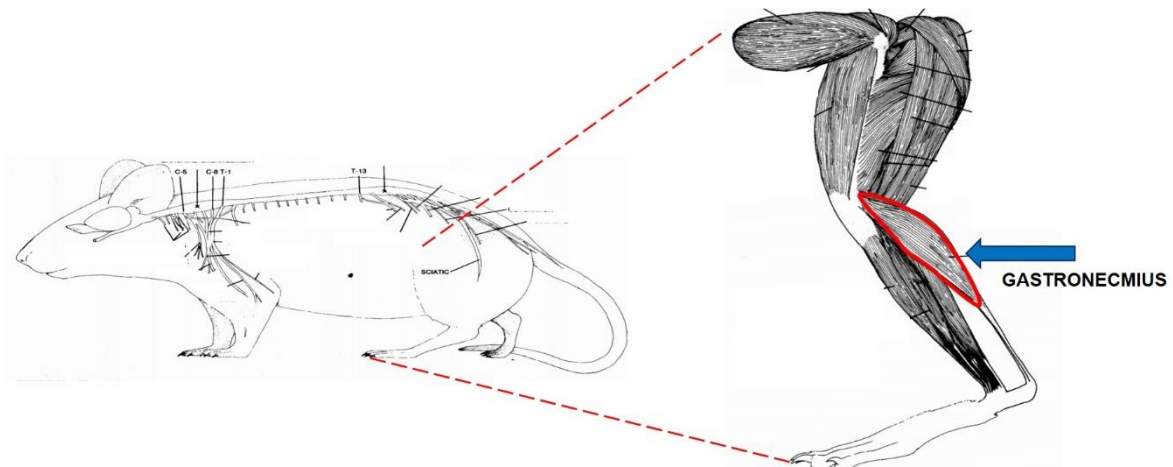


Figura 10. Esquema de la localización del músculo *gastronecmius* en la rata. Se muestra la ubicación del músculo *gastronecmius* (flecha azul) dónde se llevó a cabo la administración intramuscular de SSI o del fragmento Hc-TeTx.

5.5 Cirugía estereotáxica

5.5.1 Localización de la región CA1 del hipocampo

Para identificar la región CA1 del hipocampo, se utilizaron las siguientes coordenadas (AP): -3.9 mm; (L): ± 3.0 mm y (DV): -2.1 mm de acuerdo con el atlas *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Paxinos y Watson, 1998). La localización se realizó mediante la inyección bilateral de 1 μ L del colorante de azul de metileno (1:1000) en la región CA1 del hipocampo (coordenadas anteriormente mencionadas) utilizando una rata, la cual fue anestesiada con ketamina/xilacina a una dosis de 75:10 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.). Posteriormente, la rata fue colocada en el instrumento estereotáxico para roedores (Stoelting Co.). Al finalizar, se extrajo el cerebro, se fijó con paraformaldehído al 4% y se realizaron cortes coronales de 150 μ m. Para verificar el sitio de lesión, los cortes coronales se observaron en un microscopio estereoscópico (Velab VE-S4) (**Fig.11**).

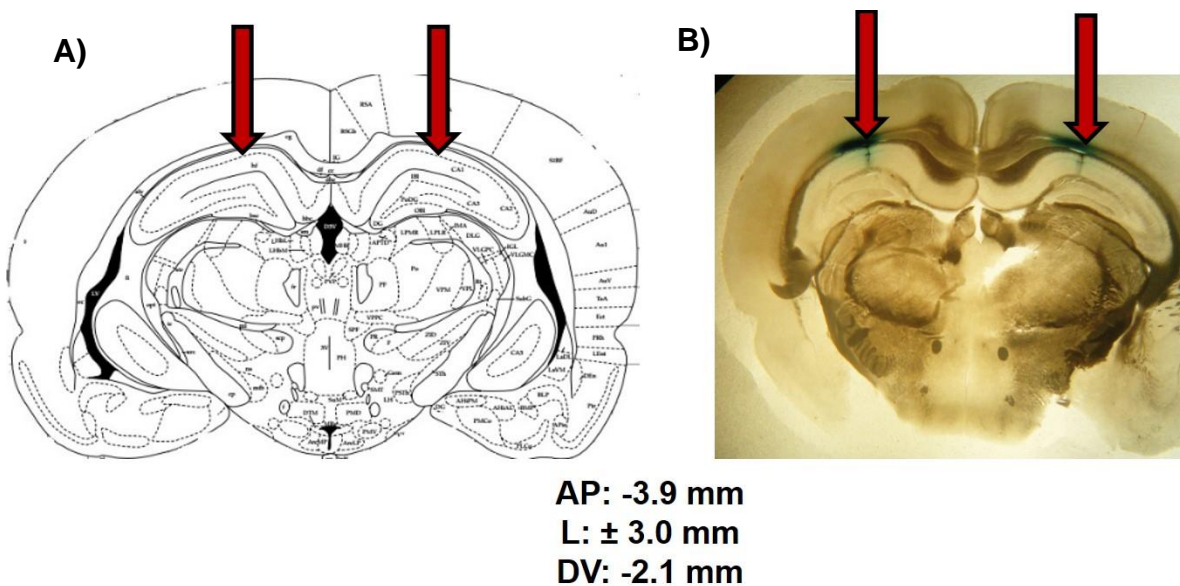


Figura 11. Localización del sitio de administración. En **A)** se muestra el esquema de un corte coronal de cerebro de rata, dónde las flechas señalan la región CA1 del hipocampo. En **B)** se muestra la fotografía de un corte coronal de 150 μ m de un cerebro de rata de la cepa Wistar, dónde las flechas indican la trayectoria de la cánula hacia la región CA1 del hipocampo.

5.5.2 Administración bilateral del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo

Una vez determinado el sitio de lesión se procedió a realizar la cirugía estereotáxica. Cada grupo experimental administrado intramuscularmente con SSI, 20 μ g/kg de Hc-TeTx y 40 μ g/kg de Hc-TeTx fue dividido aleatoriamente en dos grupos para la administración bilateral de SSI y A β 25-35 por cirugía estereotáxica. De tal manera que se formaron seis grupos experimentales: (1) SSI + SSI, (2) SSI + A β 25-35, (3) 20 μ g/kg Hc-TeTx + SSI, (4) 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35, (5) 40 μ g/kg Hc-TeTx + SSI y (6) 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35.

Para realizar la cirugía estereotáxica, cada uno de los sujetos experimentales fue anestesiado con ketamina/xilacina una dosis de 75:100 mg/kg por vía i.p. y se procedió a colocarlos en el instrumento estereotáxico para roedores. Se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm de largo, se removió el periostio para localizar bregma y se ubicó la región CA1 del hipocampo (AP: -3.9 mm; L: \pm 3.0 mm y DV: -2.1 mm). Se administró bilateralmente un volumen de 1 μ L de SSI o A β 25-35 con ayuda de una microjeringa (Hamilton) acoplada a una bomba de infusión (Nanomite, Harvard Apparatus) programada a una velocidad de 0.2 μ L/min. Posterior a cada administración se esperaron 5 minutos para la difusión de las soluciones antes de retirar la jeringa. Al finalizar la cirugía todos los animales fueron suturados y administrados con 10 UI de antibiótico (enrofloxacina) por vía intramuscular. Se alojaron en sus cajas y fueron llevados al vivario para su completa recuperación.

5.6 Laberinto acuático de Morris

El Laberinto Acuático de Morris (LAM) fue diseñado por Richard Morris en 1984 para evaluar aprendizaje y memoria espacial en roedores. El modelo consta de una tina circular que mide 170 cm de diámetro y 60 cm de alto. La tina se dividió imaginariamente en cuatro cuadrantes (Noreste, Sureste, Noroeste, Suroeste) dentro de los cuáles se colocó una plataforma de escape, en el cuadrante Sureste, de 30 cm de altura y 12 cm de diámetro. De igual manera se asignaron cuatro puntos de partida para los animales (Norte, Sur, Este y Oeste) y se colocaron señales intra-

laberínticas (dentro de la tina) y señales extra-laberínticas (ubicadas en las paredes de la habitación) (**Figura 12**).

Durante las pruebas conductuales, la tina ocupó $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con agua y se mantuvo a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Antes de iniciar cada prueba (aprendizaje y memoria) los animales fueron trasladados al cuarto de experimentación 15 minutos antes de iniciar la prueba para favorecer su habituación y disminuir el estrés.

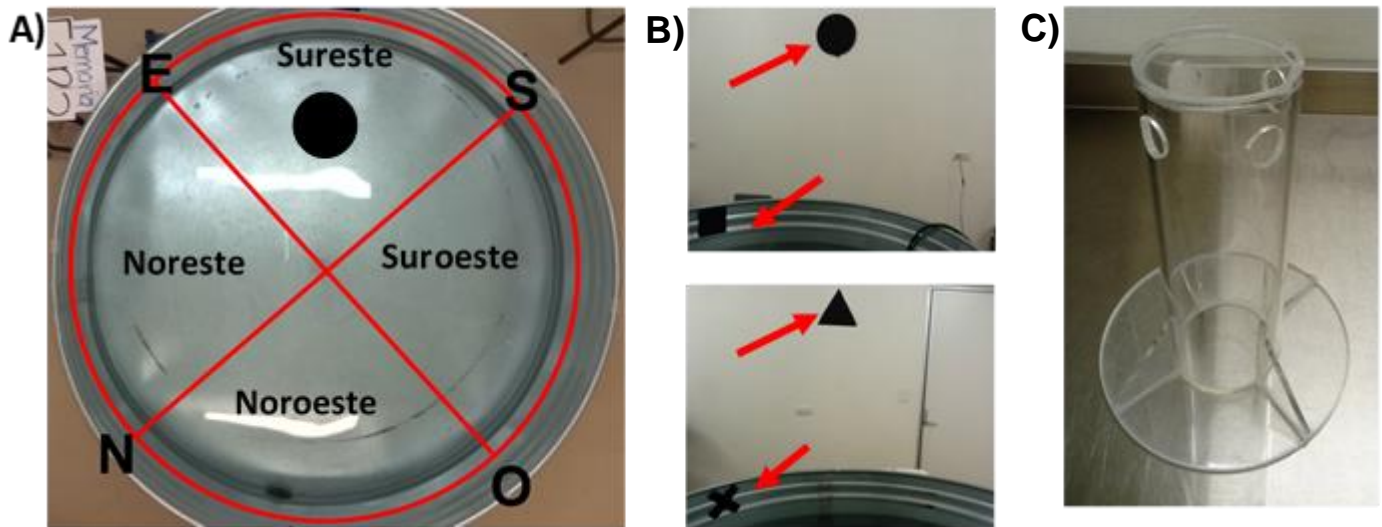


Figura 12. Laberinto acuático de Morris. En **A)** se muestra el laberinto acuático de Morris compuesto de una tina circular dividida imaginariamente en cuatro cuadrantes y la localización de la plataforma de escape. En **B)** se muestran las señales extralaberínticas colocadas en las paredes de la habitación y las señales intralaberínticas dentro de la tina. En **C)** se muestra la plataforma de escape hecha de acrílico que se coloca dentro del cuadrante Sureste.

5.6.1 Prueba de aprendizaje espacial

La prueba de aprendizaje se realizó 10 días post-cirugía con un programa de 4 ensayos por día con un intervalo de 50 minutos entre ellos. En cada ensayo los animales, se tomaron del dorso y se colocaron en un punto cardinal (en el siguiente orden: norte, este, sur y oeste). Este procedimiento se repitió por 5 días consecutivos en las mismas condiciones. Al inicio de cada prueba los animales tuvieron un máximo de 90 segundos para encontrar la plataforma de escape que fue colocada 1 cm bajo del agua en el cuadrante **sureste**. Si los animales no

lograron localizar la plataforma de escape, fueron guiados hacia la plataforma y permanecieron durante 30 segundos. Los parámetros evaluados fueron la latencia de escape (segundos) y las trayectorias de navegación.

5.6.2 Prueba de memoria espacial

La prueba de memoria se realizó 24 días post-cirugía y, a diferencia de la prueba de aprendizaje, la plataforma de escape fue retirada del laberinto acuático de Morris. Los animales realizaron un programa de 4 ensayos con un intervalo de 50 minutos entre ellos en un solo día. En cada ensayo, los animales tuvieron un máximo de 90 segundos para realizar una trayectoria libre en la búsqueda de la plataforma. Se evaluó la latencia al primer cruce con el cuadrante blanco y en la zona exacta donde se encontraba la plataforma, el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco, el número de cruces en el cuadrante blanco y en la zona exacta donde se encontraba la plataforma, además de las trayectorias de navegación.

5.7 Pruebas estadísticas

Los resultados obtenidos se graficaron y posteriormente fueron analizados estadísticamente en el programa GraphPad Prism 5. Todos los datos se expresaron como la media \pm el EEM (error estándar de la media). Previamente, se determinó si los datos expresaban una distribución normal o no mediante una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Las pruebas estadísticas se realizaron de acuerdo con el comportamiento de los datos y se consideró $P < 0.05$ como significativa.

5.7.1 Pruebas estadísticas que se aplicaron a los datos de aprendizaje y de memoria

❖ Prueba de aprendizaje espacial:

Latencia al escape en segundos: ANOVA de una vía post-test Newman-Keuls

❖ Prueba de memoria espacial:

Latencia al primer cruce en segundos: ANOVA de una vía post-test Newman-Keuls

Tiempo de permanencia en el cuadrante blanco en segundos: ANOVA de una vía post-test Newman-Keuls

Número de cruces en el cuadrante blanco: ANOVA de una vía post-test Newman-Keuls

Número de cruces en la zona exacta de la plataforma: ANOVA de una vía post-test Newman-Keuls

Porcentaje del número de cruces en la zona de la plataforma con respecto al número de cruces en el cuadrante blanco: ANOVA de una vía post-test Newman-Keuls

6. RESULTADOS

6.1 La administración intramuscular de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg de Hc-TeTx no modifican la latencia al escape en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM

El análisis de la prueba de aprendizaje espacial se realizó a través del registro de la latencia para encontrar la plataforma de escape durante los cinco días que se llevó a cabo la prueba conductual (**Figura 13**). Este registro refiere al tiempo desde que los animales fueron colocados en un punto de partida de la tina hasta que encontraron la plataforma de escape que se hallaba en el cuadrante sureste, durante los cuatros ensayos de cada día.

Todos los grupos experimentales disminuyeron gradualmente la latencia al escape hasta el último día de ensayos de aprendizaje, es decir, que todos los animales aprendieron a localizar la plataforma de escape. Se logra observar que tanto en el primer día de aprendizaje como en el segundo y tercer día de aprendizaje, el grupo de 20 μ g/kg Hc-TeTx + SSI presentó una mayor latencia de escape con respecto a los otros grupos experimentales (**Tabla 2**).

De la misma manera que sucedió con el grupo de 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 en el cuarto día de aprendizaje dónde presentó un aumento de la latencia al escape con respecto a los demás grupos experimentales (**Tabla 2**). Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran una diferencia estadísticamente significativa entre grupos ni entre los días de aprendizaje (ANOVA de una vía $p < 0.05$).

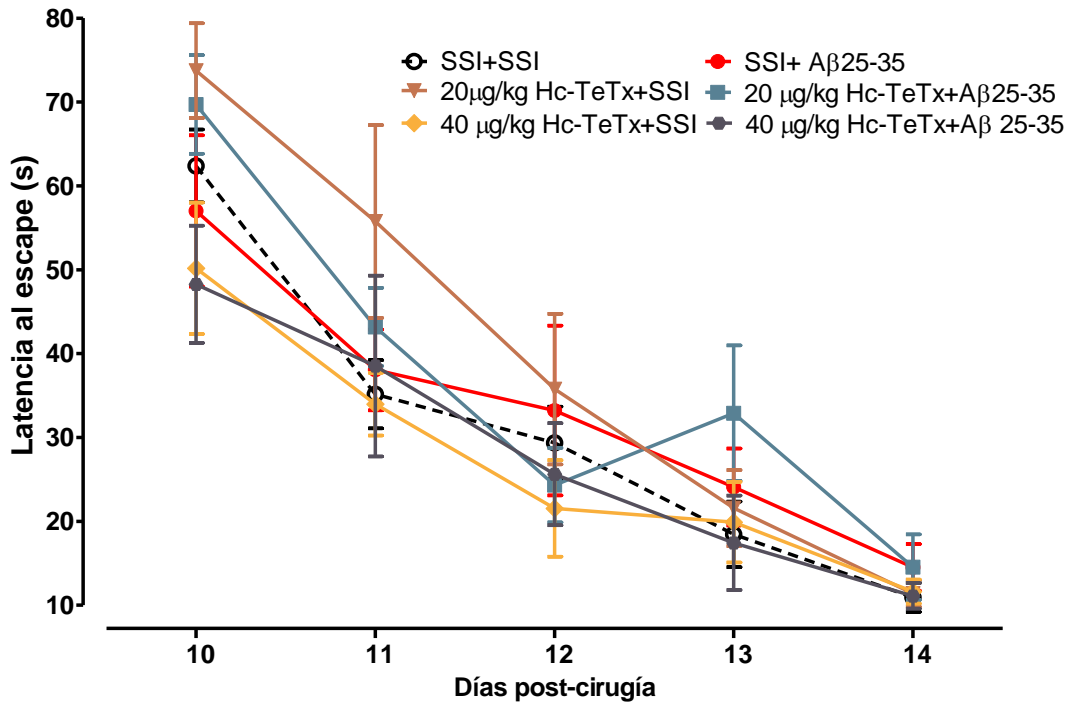


Figura 13. La administración intramuscular de 20 µg/kg y 40 µg/kg de Hc-TeTx no modifican la latencia al escape en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM. La prueba de aprendizaje se realizó del día 10 al 14 día post-cirugía. En el gráfico se muestra la latencia al escape en segundos (media ± EEM) de los grupos SSI+SSI (n=6), 20 µg/kg Hc-TeTx + SSI (n=5), 40 µg/kg Hc-TeTx + SSI (n=5), SSI + Aβ25-35 (n=6), 20 µg/kg Hc-TeTx + Aβ25-35 (n=6) y 40 µg/kg Hc-TeTx + Aβ25-35 (n=5). Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía y post-test Newman-Keuls, p<0.05.

TABLA 2. Valores de la latencia al escape (s)

GRUPOS	LATENCIA AL ESCAPE (s)				
	Día 10 post-cirugía	Día 11 post-cirugía	Día 12 post-cirugía	Día 13 post-cirugía	Día 14 post-cirugía
SSI+SSI	62.3 ± 4.3	35.1 ± 4.0	29.3 ± 4.3	18.4 ± 3.9	10.9 ± 1.7
20 µg/kg Hc-TeTx + SSI	73.74 ± 5.6	55.7 ± 11.4	35.7 ± 8.9	21.5 ± 4.5	11.4 ± 1.5
40 µg/kg Hc-TeTx + SSI	50.1 ± 7.8	33.9 ± 3.7	21.5 ± 5.7	19.9 ± 4.8	11.6 ± 1.4
SSI + Aβ25-35	57.0 ± 9.0	38.0 ± 4.8	33.2 ± 10.1	24.1 ± 4.5	14.5 ± 2.7
20 µg/kg Hc-TeTx + Aβ25-35	69.7 ± 5.8	43.1 ± 4.6	24.3 ± 4.4	32.9 ± 8.0	14.5 ± 3.9
40 µg/kg Hc-TeTx + Aβ25-35	48.2 ± 6.9	38.5 ± 10.7	25.6 ± 6.0	17.4 ± 5.6	11.1 ± 1.5

Tabla 2. Valores de la latencia al escape (s) durante el aprendizaje espacial. La prueba de aprendizaje se realizó del día 10 al 14 día post-cirugía. En la tabla se muestran los valores de la latencia al escape en segundos (media ± EEM) de cada grupo experimental.

6.2 La administración intramuscular de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg de Hc-TeTx no modifican la trayectoria de navegación ni la distancia recorrida en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM

La evaluación de las trayectorias de navegación se realizó por medio de las estrategias que utilizaron los grupos experimentales en la búsqueda de la plataforma y, también se llevó a cabo el registro de la distancia recorrida en metros (m) que realizaron los animales durante los cinco días de aprendizaje para evaluar su capacidad que poseen de recuperar la información previamente adquirida.

Se observa que en el día 10 post-cirugía, que corresponde al primer día de la prueba de aprendizaje espacial, todos los grupos experimentales presentaron una distancia recorrida que sobrepasó los 10 m (**Figura 14**) correlacionándose con las trayectorias que realizaron los animales. Las trayectorias que desempeñaron los grupos experimentales se le conoce como tigmotaxis (**Figura 15**), es decir, trayectorias que solo se enfocan en la periferia de la tina sin tener éxito en el hallazgo de la ubicación de la plataforma de escape.

La distancia recorrida que se observa en los días 11 y 12 post-cirugía disminuyó con respecto al día 10 post-cirugía (**Figura 14**) en todos los grupos experimentales (**Tabla 3**) y en las rutas de navegación se aprecia que conforme avanzan los días de aprendizaje, los animales realizan exploraciones de búsqueda aleatoria, es decir, realizan trayectorias amplias hacia la periferia y en las zonas céntricas de la tina para tener un mayor acercamiento hacia la zona exacta dónde se ubicaba la plataforma de escape para aumentar las probabilidades de encontrarla (**Figura 13 y 14**).

Con respecto al día 13 post-cirugía se logra apreciar que el recorrido de las trayectorias disminuye más con respecto a los días anteriores (**Figura 14**), a pesar de que el grupo 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 presenta un aumento con respecto a los otros grupos experimentales (**Tabla 3**), sin embargo, este grupo logra encontrar la plataforma de escape. Aunado a que los animales comenzaron a realizar búsquedas activas y dirigidas hacia la zona de la plataforma de escape (**Figura 15**).

Finalmente, el día 14 post-cirugía todos los grupos experimentales disminuyeron la distancia recorrida con respecto a los días anteriores (**Figura 14**), consecuencia de que los animales realizan nados directos hacia la zona exacta de la plataforma desde que inicia la prueba de aprendizaje (**Figura 15**) a excepción del grupo SSI + A β 25-35. El grupo SSI + A β 25-35 aprendió a localizar la plataforma de escape, sin embargo, se observa que el nado ejecutado consiste en una reorientación, en el cual el sujeto experimental no alcanza a llegar a la plataforma de escape, orienta su cuerpo hacia el cuadrante opuesto al cuadrante blanco, toca la pared de la tina y regresa hacia el cuadrante donde se encuentra la plataforma de escape. Al contrario del grupo SSI + A β 25-35, el grupo de 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 y el grupo de 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 presentan una trayectoria de nado dirigido hacia la plataforma de escape similar al grupo SSI+SSI (**Figura 15**).

Los resultados obtenidos de la distancia recorrida (m) no muestran una diferencia estadísticamente significativa entre grupos ni entre los días de aprendizaje (ANOVA de una vía $p < 0.05$).

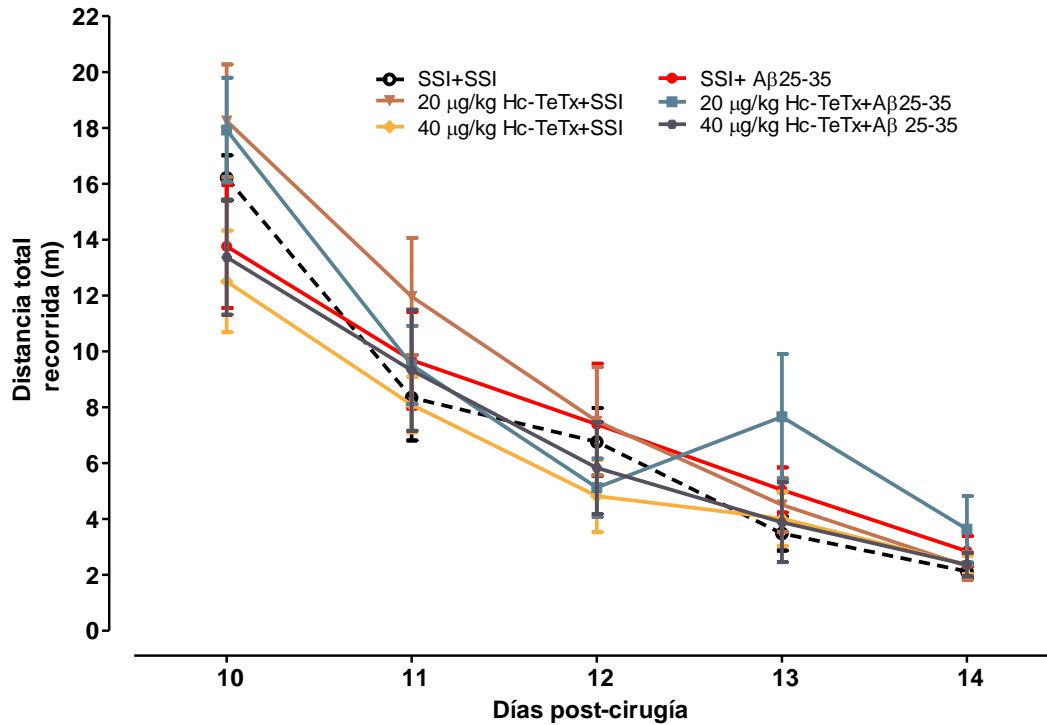


Figura 14. La administración intramuscular de 20 µg/kg y 40 µg/kg de Hc-TeTx no modifican la distancia recorrida en la prueba de aprendizaje espacial en el LAM. La prueba de aprendizaje se realizó del día 10 al 14 día post-cirugía. En el gráfico se muestra la distancia recorrida en metros (media ± EEM) de los grupos SSI+SSI (n=6), 20 µg/kg Hc-TeTx + SSI (n=5), 40 µg/kg Hc-TeTx + SSI (n=5), SSI + A β 25-35 (n=6), 20 µg/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (n=6) y 40 µg/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (n=5). Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía y post-test Newman-Keuls, $p < 0.05$.

TABLA 3. Valores de la distancia total recorrida (m)

GRUPOS	DISTANCIA TOTAL RECORRIDA (m)				
	Día 10 post-cirugía	Día 11 post-cirugía	Día 12 post-cirugía	Día 13 post-cirugía	Día 14 post-cirugía
SSI+SSI	16.2 ± 1.8	8.3 ± 1.8	6.7 ± 1.4	3.4 ± 0.6	2.1 ± 0.3
20 µg/kg Hc-TeTx + SSI	18.2 ± 1.8	11.9 ± 1.9	7.4 ± 1.5	4.5 ± 0.9	2.3 ± 0.4
40 µg/kg Hc-TeTx + SSI	12.5 ± 2.0	8.0 ± 1.4	4.8 ± 1.2	4.0 ± 0.9	2.3 ± 0.5
SSI + A β 25-35	13.7 ± 1.8	9.6 ± 1.9	7.3 ± 1.4	5.0 ± 0.8	2.8 ± 0.5
20 µg/kg Hc-TeTx + A β 25-35	17.9 ± 1.7	9.5 ± 1.8	5.1 ± 1.0	7.6 ± 1.4	3.6 ± 1.1
40 µg/kg Hc-TeTx + A β 25-35	13.3 ± 1.9	9.3 ± 1.6	5.8 ± 1.3	3.8 ± 1.0	2.3 ± 0.4

Tabla 3. Valores de la distancia total recorrida (m) durante el aprendizaje espacial. La prueba de aprendizaje se realizó del día 10 al 14 día post-cirugía. En la tabla se muestran los valores de la distancia total recorrida en metros (media ± EEM) de cada grupo experimental.

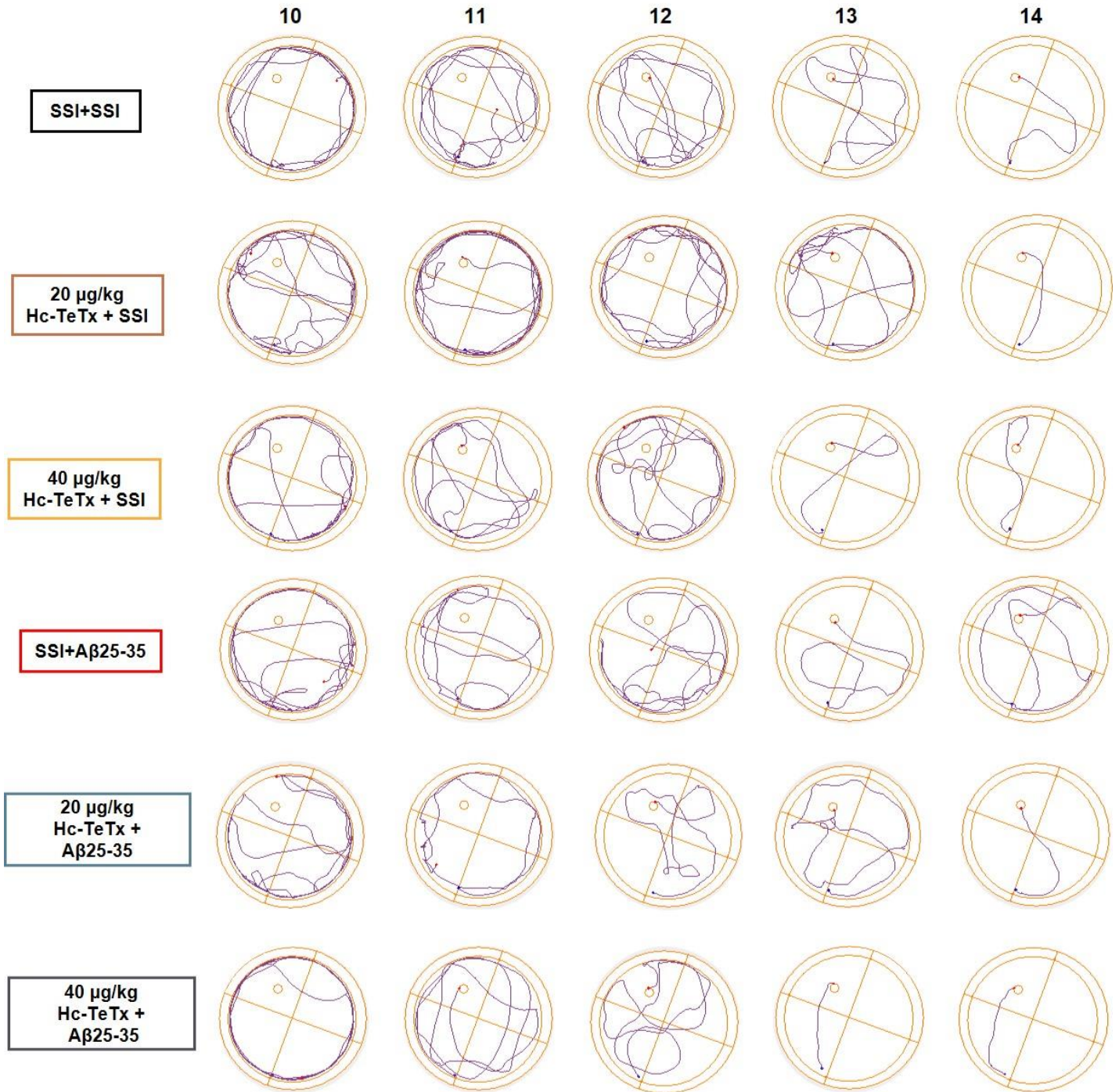


Figura 15. La administración intramuscular de 20 µg/kg y 40 µg/kg de Hc-TeTx no modifican las trayectorias de navegación durante el aprendizaje espacial. En el panel se muestran las trayectorias representativas del desempeño realizado para encontrar la plataforma de escape durante los cinco días de aprendizaje de todos los grupos experimentales. Cada esquema representa a un sujeto experimental.

6.3 La administración intramuscular de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg de Hc-TeTx previene el deterioro de la memoria espacial en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo en el LAM

La prueba de memoria espacial se evaluó al día 24 post-cirugía (diez días después del último día de aprendizaje espacial) en un único ensayo dónde se retiró la plataforma de escape. La latencia al primer cruce (**Figura 16A**) se refiere al tiempo que los animales invirtieron en nadar para realizar el primer cruce al sitio donde se encontraba la plataforma de escape, una vez que fueron colocados en el punto de partida. El grupo SSI + A β 25-35 (41.6 ± 10.1 s) muestra una tendencia a incrementar la latencia al primer cruce con respecto a los grupos SSI + SSI (23.0 ± 9.5 s), 20 μ g/kg Hc-TeTx + SSI (31.0 ± 9.6 s), 40 μ g/kg Hc-TeTx + SSI (14.3 ± 7.4 s), 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (20.5 ± 6.9) y 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (10.9 ± 2.3 s) sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

El tiempo de permanencia en el cuadrante blanco (**Figura 16B**) fue el siguiente parámetro evaluado. Este parámetro representa el tiempo en el que los sujetos experimentales nadaron en el cuadrante sureste dónde se hallaba la plataforma de escape. Se aprecia que tanto el grupo de 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (30.8 ± 3.0 s) como el grupo 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (31.9 ± 3.3 s) permanecieron más tiempo en el cuadrante blanco en comparación al grupo SSI + A β 25-35 (20.7 ± 5.2 s), pero no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

También se evaluó el número de cruces en el cuadrante blanco (**Figura 16C**). Este parámetro indica cómo los animales asocian las señales intra- y extra-laberínticas con respecto a la plataforma de escape, pero este parámetro no necesariamente infiere que los animales recuerden el lugar exacto de la plataforma. Los resultados no muestran diferencia estadísticamente entre los grupos experimentales ($p > 0.05$), a pesar de que el grupo de 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (8.6 ± 1.0 cruces) y el grupo 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (10.1 ± 1.1 cruces) tienden a cruzar más veces en el cuadrante blanco.

El número de cruces en la zona de la plataforma (**Figura 16D**) es un parámetro que permite conocer si los animales recuerdan la ubicación exacta donde se encontraba la plataforma de escape, por lo tanto, se decidió evaluar este parámetro. El grupo de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + A β 25-35 (4.4 ± 0.7 cruces) cruza más veces el lugar donde se encontraba la plataforma de escape comparado a los otros grupos experimentales: SSI + SSI (2.0 ± 0.2 cruces), 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + SSI (2.0 ± 0.4 cruces), 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + SSI (1.8 ± 0.5 cruces), SSI + A β 25-35 (1.16 ± 0.3 cruces) pero no con el grupo 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + A β 25-35 (2.8 ± 0.7 cruces).

El último parámetro para evaluar fue el porcentaje del número de cruces en la zona de la plataforma con respecto al número de cruces en el cuadrante blanco (**Figura 16E**), en este parámetro no se encontraron cambios significativos ($p > 0.05$) entre grupos experimentales a pesar de que se observa una tendencia a incrementar el porcentaje de número de cruces en la zona de la plataforma/número de cruces en el cuadrante blanco por parte del grupo de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + A β 25-35 (37.2 ± 6.2 %) y el grupo de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + A β 25-35 (29.4 ± 6.6 %) con respecto al grupo SSI + A β 25-35 (17.0 ± 4.6 %).

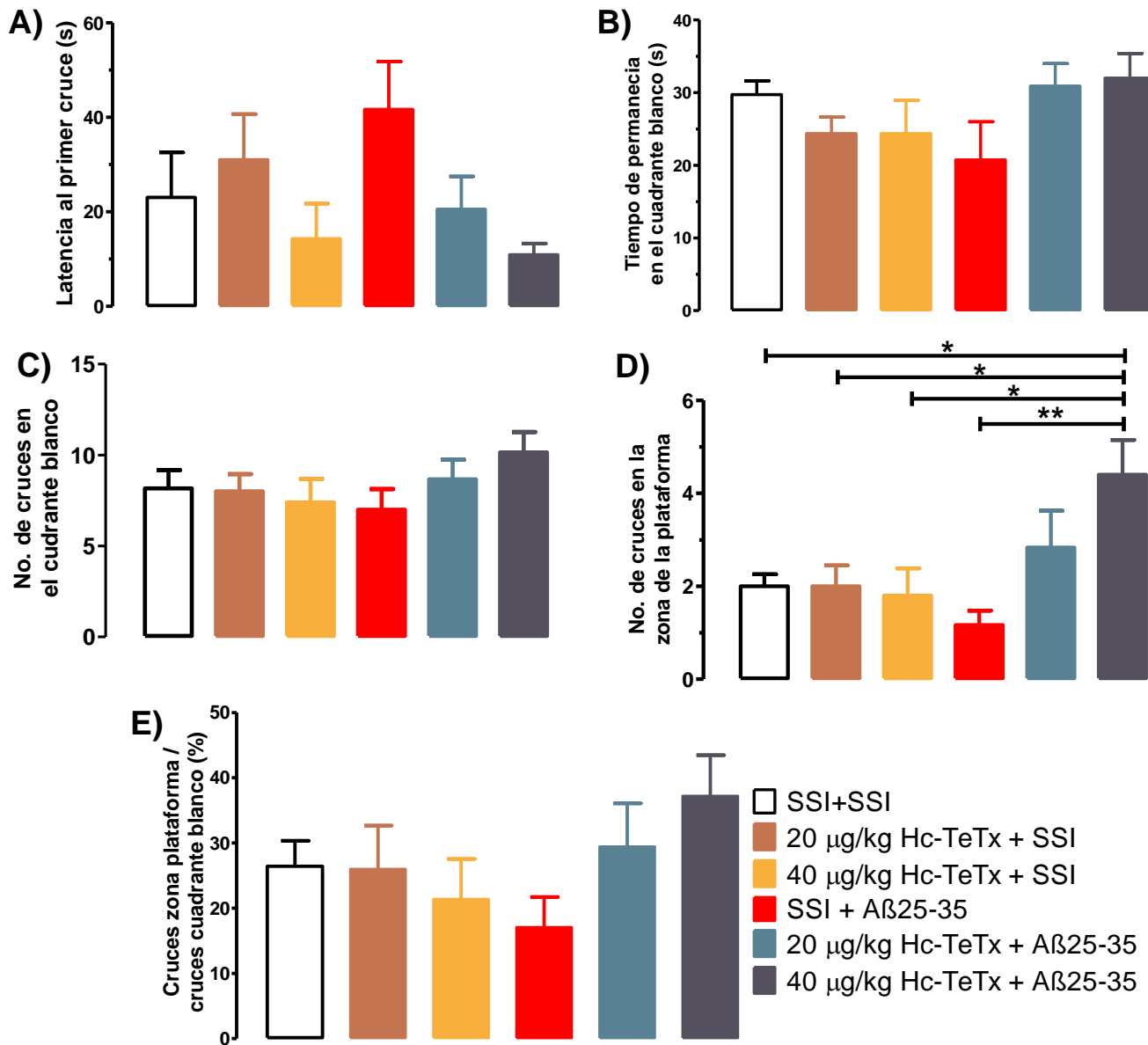


Figura 16. La administración intramuscular de 20 µg/kg y 40 µg/kg de Hc-TeTx evita el deterioro de la memoria espacial en ratas lesionadas con el A β 25-35 en la región CA1 del Hp.

Se graficó en **A)** la latencia al primer cruce, **B)** tiempo de permanencia en el cuadrante blanco, **C)** número de cruces de cruces en el cuadrante blanco, **D)** número de cruces en la zona de la plataforma y **E)** el porcentaje del número de cruces en la zona de la plataforma/ número de cruces en el cuadrante blanco. Se muestra en los gráficos la media \pm EEM de los grupos grupos SSI+SSI (n=6), 20 µg/kg Hc-TeTx + SSI (n=5), 40 µg/kg Hc-TeTx + SSI (n=5), SSI + A β 25-35 (n=6), 20 µg/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (n=6) y 40 µg/kg Hc-TeTx + A β 25-35 (n=5).. Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía y post-test Newman-Keuls, **p<0.01; *p<0.05.

6.4 La administración intramuscular de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg de Hc-TeTx mejora el desempeño de las trayectorias de nado en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo durante la prueba de memoria espacial

Las trayectorias de navegación permiten conocer la capacidad que poseen los sujetos experimentales para evocar la información previamente adquirida y saber las estrategias que son utilizadas para encontrar la plataforma de escape. Durante la prueba de aprendizaje espacial las trayectorias nos indican que los sujetos experimentales han adquirido la información de la ubicación de la plataforma de escape (**Figura 14**), pero a diferencia de esta prueba, en la prueba de memoria espacial la plataforma es retirada. El análisis de las trayectorias corresponde al primer ensayo de la prueba de memoria espacial (**Figura 17A**) y el análisis del tiempo de permanencia a través de los mapas de calor (**Figura 17B**).

El grupo SSI+SSI presentó una trayectoria de auto-orientación al primer cruce del lugar donde se hallaba la plataforma de escape, al acercarse a la plataforma, pero no lograron llegar a la zona exacta y volver a reorientar su cuerpo para regresar al cuadrante blanco y atravesar exactamente dónde se encontraba la plataforma de escape. En el resto de la trayectoria también tuvieron nados dirigidos hacia el cuadrante sureste (cuadrante blanco) y hacia la plataforma de escape realizando varios cruces en esta zona. Además, en el mapa de calor se puede observar que el grupo permanece la mayoría del tiempo en el cuadrante blanco.

Los grupos de 20 μ g/kg Hc-TeTx + SSI y de 40 μ g/kg Hc-TeTx + SSI presentan una trayectoria de escaneo durante los 90 segundos que dura la prueba de memoria espacial, sin embargo la trayectoria al primer cruce con el sitio donde se encontraba la plataforma de escape es similar al de auto-orientación, donde al comenzar la trayectoria se acercan al cuadrante blanco sin éxito de llegar al sitio exacto de la plataforma para volver a orientar su cuerpo y después cruzar en el sitio de la plataforma de escape.

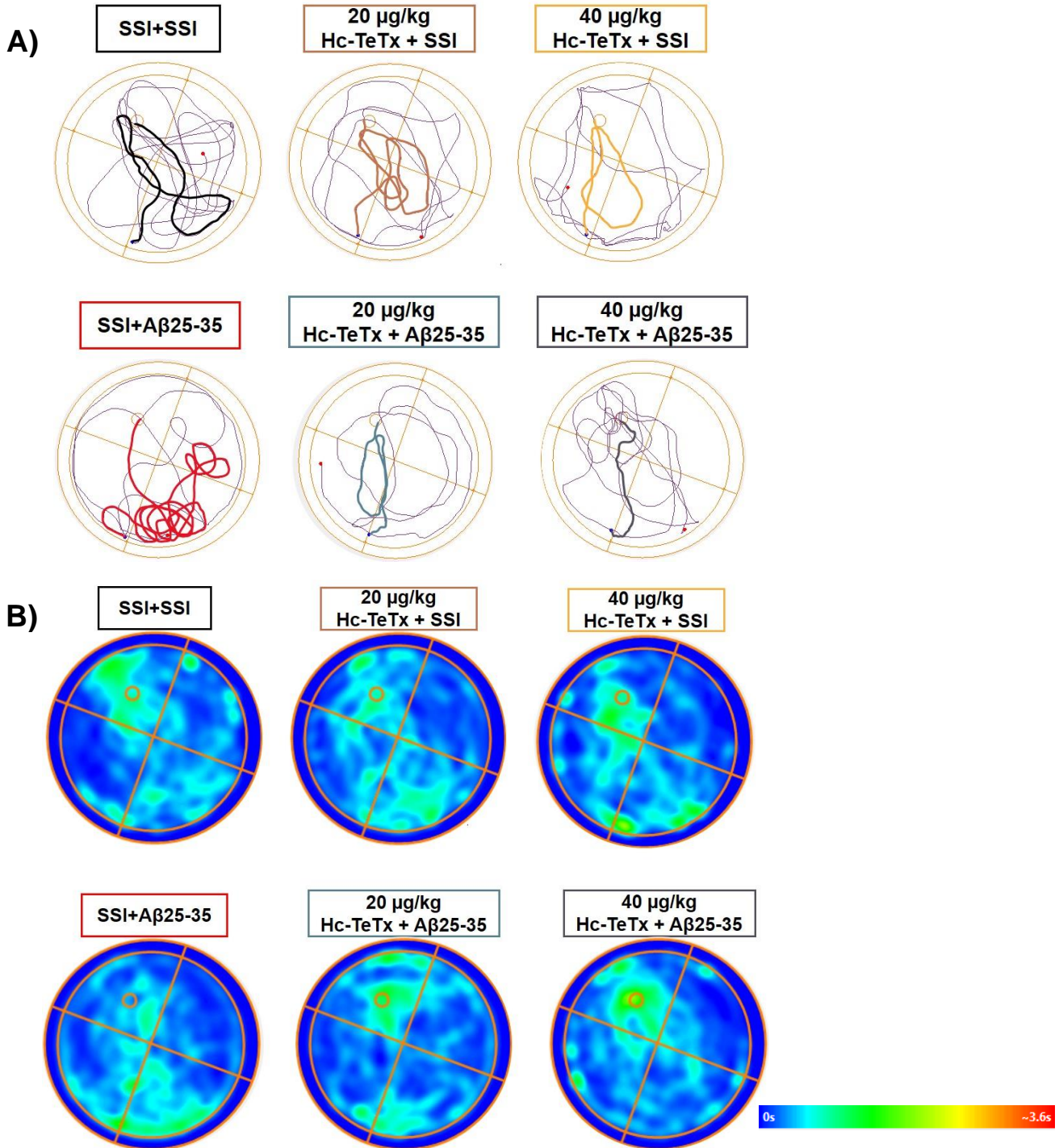


Figura 17. La administración intramuscular de 20 µg/kg y 40 µg/kg de Hc-TeTx mejora el desempeño de las trayectorias de nado en la prueba de memoria espacial en ratas lesionadas con el A β 25-35. **A)** Se muestran las trayectorias representativas del desempeño de la prueba de memoria espacial. Se resalta en color oscuro la trayectoria al primer cruce donde se encontraba la plataforma de escape. **B)** Se muestran los mapas de calor correspondientes a la media del tiempo de permanencia durante los 90 segundos de la prueba de memoria espacial.

En los mapas de calor podemos observar que, en ambos grupos de 20 μ g/kg Hc-TeTx + SSI y de 40 μ g/kg Hc-TeTx + SSI, permanecen la mayor parte del tiempo en el cuadrante blanco similar al grupo SSI + SSI.

Por otro lado, el grupo SSI + A β 25-35 a diferencia de todos los grupos experimentales presenta una trayectoria enfocada hacia el cuadrante opuesto donde se localizaba la plataforma de escape, aunque se observa que realizó solo pocos cruces hacia la zona exacta donde se localizaba la plataforma de escape su trayectoria durante la prueba demuestra una búsqueda aleatoria. Lo anterior descrito se relaciona con el mapa de calor que representa el tiempo de permanencia durante toda la prueba y se observa que el cuadrante opuesto al cuadrante blanco la zona se encuentra coloreada de un azul más intenso.

Finalmente, los grupos de 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 y el grupo de 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 presentan una trayectoria de nado dirigido en el primer cruce con la zona exacta donde se encontraba la plataforma de escape, sin embargo, el resto de la trayectoria el grupo de 20 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 presenta una búsqueda de escaneo y auto-orientación para poder cruzar la zona exacta de la plataforma. En cambio, el grupo de 40 μ g/kg Hc-TeTx + A β 25-35 su trayectoria se enfoca en la zona del cuadrante blanco, realizando nados directos hacia la zona exacta de la plataforma, relacionándolo con lo que se observa en el mapa de calor, donde la zona exacta de la plataforma y el cuadrante blanco se colorean de color verde, es decir, permanecen mayor tiempo ahí que en las otras zonas.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años, evidencias experimentales han reportado y destacado que el fragmento Hc-TeTx posee capacidades neurotróficas al imitar la acción de las neurotrofinas (Gil et al., 2000,2001; Moreno-Igoa et al.,2010). Por tal motivo, evaluar el efecto de la administración intramuscular de las dosis de 20 μ g/kg y de 40 μ g/kg del fragmento Hc-TeTx en ratas previo a lesionarlas en la región CA1 del hipocampo con el péptido A β 25-35 proporcionará información del potencial trófico del fragmento Hc-TeTx sobre los procesos de aprendizaje y memoria espacial, y por lo tanto proponer que el efecto del fragmento Hc-TeTx es dependiente de la dosis.

El hipocampo es una de las estructuras más estudiadas, puesto que se ha propuesto que su función es importante para el proceso de memoria (Broadbent *et al.*, 2004; Martin & Clark., 2007), y debido a esto, en el laboratorio de Neurofarmacología se ha demostrado que el daño experimental con la administración del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo en rata causa déficits en el aprendizaje y memoria de tipo espacial (Netzahualcoyotzi-Piedra., 2009; Limón *et al.*, 2009; Díaz *et al.*,2010, Patricio-Martínez et al., 2019).

En el primer objetivo de este proyecto se utilizó el LAM para evaluar el aprendizaje espacial durante 5 días consecutivos (día 10-14 post-cirugía) ya que el hipocampo es una región que participa activamente en la adquisición de la información (O'Keefe y Nadal, 1978; Morris, 1984; Martin & Clark., 2007). En este proyecto se demostró que el aprendizaje espacial no se modificó en ningún grupo experimental (**Figura 13**), aunque en previos estudios se ha demostrado que la lesión bilateral con el péptido A β 25-35 en el hipocampo induce el deterioro del proceso de adquisición en el LAM (Netzahualcoyotzi-Piedra, 2009; Ortega *et al.*,2014; Zeng *et al.*,2019) y cuando se evaluó en el laberinto radial de 8 brazos (Pérez-Severiano *et al.*,2004; Cuevas *et al.*,2009; Díaz *et al.*,2010). Sin embargo, el resultado encontrado en este proyecto puede correlacionar con otros reportes previos (Ramírez *et al.*, 2018, 2019), ya que al evaluar el aprendizaje 6 días después de la inyección de este péptido no se encontraron cambios en la tarea de aprendizaje espacial pero sí en el desempeño de memoria espacial.

En la región hipocampal durante el aprendizaje espacial se lleva a cabo la formación de mapas espaciales o cognitivos (O'Keefe y Nadal, 1978) siendo de este un aprendizaje espacial de tipo aloentrico que se encuentra altamente relacionado con la navegación espacial a través de la integración por rutas y puntos de referencias (señales distales). En el primer día de aprendizaje todos los animales realizaron trayectorias de tigmotaxis, es decir, trayectorias que se encuentran estrechamente relacionadas con procesos de ansiedad, pero no con procesos de aprendizaje espacial (Graziano et al., 2003; Korz., 2006). Esto implica que la búsqueda se traduzca en un número menor de intentos para poder localizar la plataforma dando como resultado una latencia mayor e igual a los 90 segundos (**Figura 13**) y una ejecución de una distancia recorrida prolongada (**Figura 14**). En los días posteriores todos los grupos experimentales progresaron de la tigmotaxis a trayectorias de búsqueda y exploración aleatoria, que se definen como trayectorias asociadas al aprendizaje espacial de tipo egocéntrico. Sin embargo, en los grupos de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + SSI y de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Hc-TeTx + A β 25-35 estas trayectorias son persistentes durante tres días consecutivos, pero en el último día, las trayectorias fueron de búsqueda directa hacia la plataforma de escape (**Figura 15**). Por lo tanto, este hecho que se encontró afirma que, durante el desarrollo de la tarea espacial, el aprendizaje egocéntrico delimita y subyace para que se comience a realizar el aprendizaje espacial de tipo aloentrico (Morris, 1984; Dimattia y Kesner, 1988), dando como resultado la precisión de nados dirigidos utilizando una matriz de señales distales y la progresiva disminución de la distancia recorrida (**Figura 14**).

Sin embargo, la estrategia del grupo SSI + A β 25-35 no correlaciona por completo con el hallazgo anterior, puesto que aprende a localizar la ubicación de la plataforma con latencias de escape y con valores de distancia recorrida similares a los demás grupos experimentales (**Figura 13,14**), pero adopta estrategias independientes de las señales distales por lo tanto su navegación se encontraría dentro de una operación memorizada basado en ruta de auto-orientación del propio cuerpo (Vorhees & Williams., 2014). Por tal motivo, se sugiere que el déficit de uso de estrategias aloentricas que se encontró en el grupo lesionado con el péptido A β 25-35 sea ocasionado porque existe una disrupción en la comunicación celular

de la región del hipocampo debido a los efectos tóxicos que comienza a desencadenar el péptido A β 25-35, mientras que los tratamientos con las dosis de 20 μ g/kg Hc-TeTx y de 40 μ g/kg del fragmento Hc-TeTx previo a la lesión, se demostró que tienen la capacidad de adquirir la información e integrar las señales distales ejecutando estrategias aloécnicas de manera similar a los grupos controles. Estas evidencias también nos permiten proponer que, además de la participación del hipocampo, otros núcleos se encuentran involucrados para el desempeño del aprendizaje espacial: el estriado, núcleo responsable de la ejecución de estrategias aloécnicas independientes de señales distales (Vorhees & Williams., 2014).

La memoria espacial no suele formarse al instante de recibir la información, sino que está constituida por tres fases: la codificación, la consolidación y la recuperación (Kandel, 2001; Squire., 2004) que dependen de la integridad del sistema glutamatérgico (Myhrer *et al.*, 2003). En este presente proyecto, se demostró que la administración intrahipocampal del péptido A β 25-35 genera un deterioro en la memoria espacial, consecuencia de la alteración en la función del hipocampo debido a los efectos tóxicos como: la generación de estrés oxidativo y nitrosativo, la formación de canales iónicos que son permeables a Ca²⁺ y la sobre activación de los NMDAR que conducen a la activación de enzimas involucradas en la generación de NO, provocando un proceso de neuroinflamación crónica que finaliza en la activación de eventos apoptóticos que determina la degeneración y muerte neuronal (Harris *et al.*, 1995; Varadajan *et al.*, 2001; Verdier y Penke., 2004; Stepanichev *et al.*, 2008; Limón *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2011,2012; Ramírez *et al.*, 2018). Estos eventos no se vieron reflejados puntualmente en el proceso de aprendizaje espacial, pero sí en la memoria espacial, asociando que el daño tóxico del péptido A β 25-35 es progresivo y al día veinticuatro post-cirugía el circuito neuronal que participa en el procesamiento y la recuperación de la información está alterada (Stepanichev *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2018).

Este déficit de memoria espacial del grupo lesionado con el péptido A β 25-35 explica por qué los animales no lograron asociar e integrar las señales distales para

la formación del mapa aloentrico, evidenciado por la tendencia a permanecer menor tiempo en el cuadrante blanco (**Figura 16B**) que se relaciona con un menor número de cruces en la zona exacta donde se encontraba la plataforma de escape (**Figura 16D**), dando como resultado la ejecución de estrategias egocéntricas (**Figura 17A, Figura 17B**). Situación que muestra, que el hipocampo participa en el desempeño de tareas espaciales.

Por otra parte, este estudio demuestra que a diferencia del grupo lesionado con el péptido A β 25-35, los grupos con la administración intramuscular de las dosis de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg del fragmento Hc-TeTx previo a la lesión intrahipocampal en la región CA1 con el péptido A β 25-35 recuperan y evocan la información al día 24 post-cirugía, demostrando que el fragmento Hc-TeTx tiene actividad trófica al interactuar con los receptores Trk ya que actúa como una neurotrofina al activar vías involucradas en la señalización y supervivencia neuronal (Gil *et al.*, 2000, 2001; Chaïb-Oukadour *et al.*, 2004). Este efecto trófico se evidencia con la tendencia en los parámetros evaluados: el aumento del tiempo de permanencia en el cuadrante blanco (**Figura 16B**), un mayor número de cruces en la zona exacta donde se encontraba la plataforma de escape (**Figura 16D**) y en la ejecución de trayectorias aloentricas (**Figura 17A**), sin embargo, se muestra un efecto mayor con la administración de 40 μ g/kg de Hc-TeTx.

Una de las vías que activa el fragmento Hc-TeTx por medio de los receptores Trk es la vía PI3-K/Akt. La vía PI3-K/Akt se encuentra involucrada en procesos de supervivencia neuronal, de manera que la activación de esta vía ocasiona la inhibición de moléculas pro-apoptóticas como BAD, molécula que promueve apoptosis, y GSK3 β (glucogéno sintasa quinasa-3 β), que se ha demostrado que en grandes cantidades de GSK3 β en cultivos neuronales produce apoptosis (Huang & Reichardt., 2003). También, la activación de los receptores Trk regula la fuerza y plasticidad sináptica en el sistema nervioso central. Por ello, otra vía de señalización celular que se activa es la vía PLC- γ , vía que controla la modulación de transmisión y plasticidad sináptica. En esta activación se promueve la liberación de Ca²⁺ que da como resultado la activación de enzimas dependientes de Ca²⁺ como la PKC

(proteína quinasa C) y las proteínas quinasas reguladas por Ca²⁺-calmodulina necesaria para el crecimiento neurítico y la estimulación de Erk, además de que en estudios se ha demostrado que la señalización de TrkB en el sitio de acoplamiento en PLC-γ es importante para el mantenimiento de LTP que se lleva en la región del hipocampo (Huang & Reichardt., 2003; Reichardt., 2006; Scott-Solomon & Kuruvilla., 2018). Por lo tanto, se sugiere que los animales que recibieron la administración intramuscular del fragmento Hc-TeTx previo a la lesión con el péptido Aβ25-35 recuperan y evocan la información de la ubicación de dónde se encontraba la plataforma de escape consecuencia de la activación de los receptores Trk.

En los resultados del presente proyecto se muestra que la administración del péptido Aβ25-35 en la región CA1 del hipocampo no modifica el aprendizaje espacial pero sí afecta el uso de estrategias de tipo aloentróico dependiente totalmente de la funcionalidad del hipocampo, indicando que existe la participación de otros núcleos cerebrales como el estriado para que se lleve a cabo la adquisición de la información, pero no se descarta la posibilidad de que el septum medial y el cerebro basal anterior también estén involucrados. Sin embargo, este déficit de estrategias aloentróicas se ve reflejado de manera progresiva en la memoria espacial donde se exhibe que el rendimiento del procesamiento y recuperación de la información se ve deteriorada debido a que existe una disrupción en la comunicación celular de la región del hipocampo. En cambio, la administración intramuscular de las dosis del fragmento Hc-TeTx previo a la lesión con el péptido Aβ25-35 mejora la recuperación de la memoria espacial, probablemente a la interacción de esta molécula protectora con los receptores Trk y su posterior activación de vías de supervivencia y proliferación neuronal. Sin embargo, es necesario indagar más sobre los mecanismos que desencadenan los Trk y la farmacocinética y farmacodinamia del fragmento Hc-TeTx en la región hipocámpal que se encarga de llevar a cabo funciones de tipo espacial, por lo cual es importante continuar con la investigación del efecto potencial neuroprotector que puede presentar el fragmento Hc-TeTx en modelos de neurodegeneración.

8. ESQUEMA HIPOTÉTICO

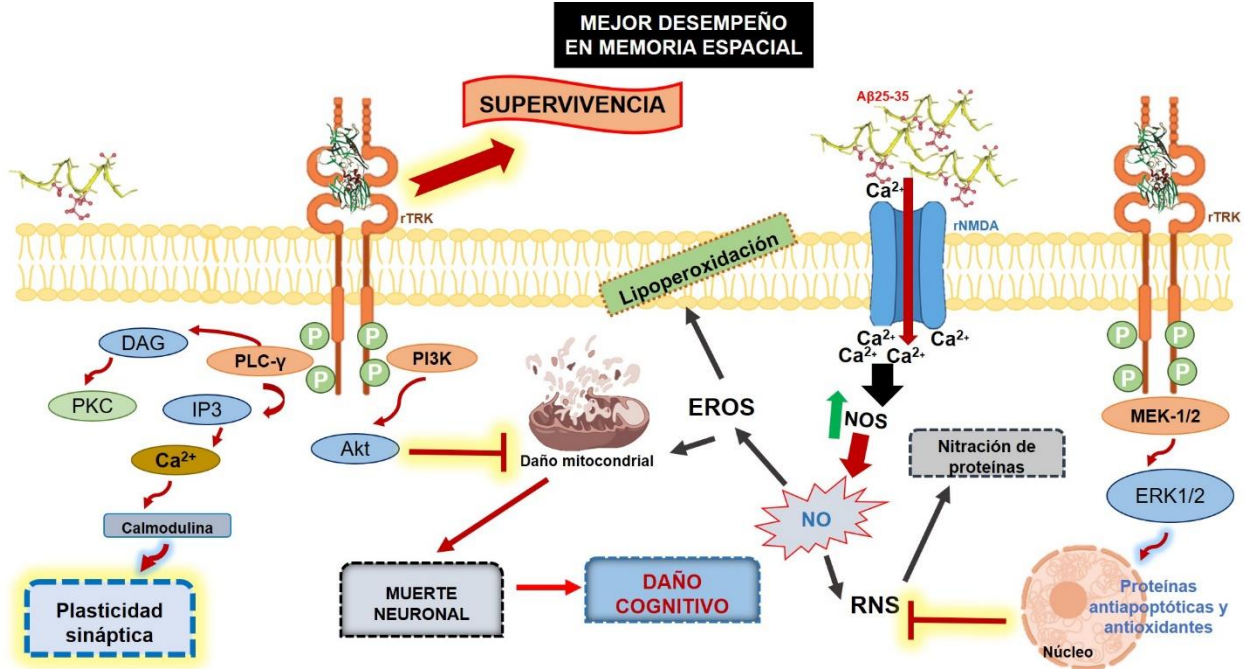


Figura 18. Esquema hipotético del efecto de la administración intramuscular de las dosis de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg del fragmento Hc-TeTx contra los efectos tóxicos del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo. El fragmento Hc-TeTx posee la capacidad de realizar transporte retrógrado desde la terminal nerviosa de una motoneurona hasta el SNC. El fragmento Hc-TeTx al ser administrado por vía intramuscular a dosis de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg un día previo a la lesión con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo previene los efectos tóxicos que desencadena dicho péptido, puesto que el fragmento Hc-TeTx es capaz de interactuar con los receptores Trk. Esta interacción, provoca la activación de vías de señalización que se encuentran involucradas en la supervivencia y diferenciación neuronal: PI3K/Akt, Ras/MAPK y PLC- γ ; evitando el proceso de apoptosis que conlleva a la muerte neuronal que resulta en un deterioro cognitivo, provocado por la acción tóxica del péptido A β 25-35. Consecuentemente se observa un mejor desempeño en la tarea de memoria espacial.

9. CONCLUSIONES

1. La administración intramuscular a una dosis de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg del fragmento C-terminal de la toxina tóxica no modifica el proceso de adquisición de información en la prueba de aprendizaje espacial en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo.
2. La administración intramuscular a una dosis de 20 μ g/kg y 40 μ g/kg del fragmento C-terminal de la toxina tóxica previene el deterioro de la memoria espacial y mejora la ejecución del desempeño en las trayectorias de navegación en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo.

10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto de la administración intramuscular de las dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del fragmento C-terminal de la toxina tóxica sobre la activación de células gliales en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo.
2. Evaluar el efecto de la administración intramuscular de las dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del fragmento C-terminal de la toxina tóxica sobre el daño neuronal en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo.
3. Evaluar el efecto de la administración intramuscular de las dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del fragmento C-terminal de la toxina tetánica sobre la activación de las vías de señalización de los receptores Trk en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo.

11. REFERENCIAS

A

- Aguilera J., Lopez L., Yavin E. (1990). Tetanus toxin-induced protein kinase C activation and elevated serotonin levels in the perinatal rat brain. *FEBS Letters* 263 (1), 61-65. doi: 10.1016 / 0014-5793 (90) 80705-n.

B

- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14515–14520. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406344101>
- Burgess, N., Becker, S., King, J. A., & O'Keefe, J. (2001). Memory for events and their spatial context: models and experiments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 356(1413), 1493–1503. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0948>
- Butterfield, D. A., & Boyd-Kimball, D. (2004). Amyloid beta-peptide (1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(4), 426–432. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00087.x>
- Butterfield, D. A., & Boyd-Kimball, D. (2018). Oxidative Stress, Amyloid- β Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 62(3), 1345–1367. <https://doi.org/10.3233/JAD-170543>

C

- Chaib-Oukadour I., Gil C., Aguilera J. (2004). The C-terminal domain of heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurons from apoptotic death: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, 90 (5), 1227-1236. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02586.x>.
- Chaib-Oukadour I., Gil C., Rodríguez-Álvarez J., Ortega A., Aguilera J. (2009). Tetanus toxin HC fragment reduces neuronal MPP⁺ toxicity. *Molecular and cellular neurosciences*, 41(3), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.03.006>
- Chen G., Xu T., Yan Y., Zhou, Y., Jiang Y., Melcher K., & Xu, H. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi:10.1038/aps.2017.28>

- Craven C.J., Dawson D.J. (1973). The chain composition of tetanus toxin. *Biochimica et Biophysica acta*, 317(2), 277-285. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90223-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90223-7)
- Cuevas, E., Limón, D., Pérez-Severiano, F., Díaz, A., Ortega, L., Zenteno, E., & Guevara, J. (2009). Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. *European journal of pharmacology*, 616(1-3), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.013>

D

- Deinhardt K., Salinas S., Verastegui C., Watson R., Worth D., Hanrahan S., Bucci C., Schiavo G. (2006). Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*, 52(2), 293-305. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.018>
- Díaz, A., Mendieta, L., Zenteno, E., Guevara, J., Limón, I.D. (2011). The role of NOS in the impairment of spatial memory and damage neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into temporal cortex. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 98(1): 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.005>
- Díaz, A., Limón, D., Chávez, R., Zenteno, E., Guevara, J. (2012). A β 25-35 injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 30(3), 505-522 <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111979>
- DiMattia, B. D., & Kesner, R. P. (1988). Spatial cognitive maps: differential role of parietal cortex and hippocampal formation. *Behavioral neuroscience*, 102(4), 471–480. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.102.4.471>
- D'Ursi, A. M., Armenante, M. R., Guerrini, R., Salvadori, S., Sorrentino, G., & Picone, D. (2004). Solution structure of amyloid beta-peptide (25-35) in different media. *Journal of medicinal chemistry*, 47(17), 4231–4238. <https://doi.org/10.1021/jm040773o>

F

- Farrar, J. J., Yen, L. M., Cook, T., Fairweather, N., Binh, N., Parry, J., & Parry, C. M. (2000). Tetanus. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 69(3), 292–301. <https://doi.org/10.1136/jnnp.69.3.292>
- Fotinou, C., Emsley, P., Black, I., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., Sinha, K. A., Fairweather, N. F., & Isaacs, N. W. (2001). The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-

linking between ganglioside receptors and the toxin. *The Journal of biological chemistry*, 276(34), 32274–32281. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103285200>

G

- Gil C., Chaib-Oukadour I., Pelliccioni P., Aguilera J. (2000). Activation of signal transduction pathways involving trkA, PLCQ-1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS letters*, 481(2), 177-182. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02002-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02002-0)
- Gil C., Chaib-Oukadour I., Blasi J., Aguilera J. (2001). HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *The Biochemical journal*, 356(Pt1),97-103. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560097>
- Graziano, A., Petrosini, L., & Bartoletti, A. (2003). Automatic recognition of explorative strategies in the Morris water maze. *Journal of neuroscience methods*, 130(1), 33–44. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(03\)00187-0](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(03)00187-0)

H

- Harris M., Carney J., Cole P., Hensley K., Howard B., Martin L. (1995). β -Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's Disease. *Neuroreport*, 6(14), 1875-1879. <https://doi.org/10.1097/00001756-199510020-00013>
- Helting, T. B., Zwisler, O., & Wiegandt, H. (1977). Structure of tetanus toxin. II. Toxin binding to ganglioside. *The Journal of biological chemistry*, 252(1), 194–198.
- Herreros J., Schiavo G. (2001). Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Molecular biology of the cell*, 12(10),2947-2960. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2947>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 72, 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>

K

- Kandel E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544), 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kirkitadze, M. D., & Kowalska, A. (2005). Molecular mechanisms initiating amyloid beta-fibril formation in Alzheimer's disease. *Acta biochimica Polonica*, 52(2), 417–423.

- Kessels R, Han E, Kappelle J y Postma A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research. Brain research reviews*, 35(3), 295–303. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00058-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00058-3)
- Korz V. (2006). Water maze swim path analysis based on tracking coordinates. *Behavior research methods*, 38(3), 522–528. <https://doi.org/10.3758/bf03192807>
- Kubo, T., Nishimura, S., Kumagae, Y., & Kaneko, I. (2002). In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *Journal of neuroscience research*, 70(3), 474–483. <https://doi.org/10.1002/jnr.10391>

L

- Lalli, G., & Schiavo, G. (2002). Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *The Journal of cell biology*, 156(2), 233–239. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106142>
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25(1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Limón ID., Díaz A., Mendieta L., Chamorro G., Espinosa B., Guevara EZ. (2009). Amyloid-beta(25–35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neuroscience research*, 63(2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.11.006>
- Luna-Muñoz, J., Harrington, C., Wischik, C., Flores-Rodríguez, P., Ávila, J., Zamudio, S., Cruz, F.D., Mena, R., Meraz-Ríos, M., & Florán-Garduño, B. (2013). Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease.

M

- Machado S., Portella C.E., Silva J.G., Velasques B., Bastos M.C., Basile L., Cagy M., Piedade R.A., Ribeiro P. (2008). Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad. *Revista de neurología*, 46(9), 543-549. <https://doi.org/10.33588/rn.4609.2007092>
- Manning KA., Erichsen JT., Evinger C. (1990). Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin. *Neuroscience*, 34(1), 251-63. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90319-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90319-y)

- Martin, S. J., & Clark, R. E. (2007). The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 64(4), 401–431. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6336-3>
- Mendieta L., Bautista E., Sánchez A., Guevara J, Herrando-Grabulosa M., Moran J., Martínez R., Aguilera J., Limón I.D. (2012). The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine. *Neuroscience research*, 74(2), 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.08.006>
- Mendieta L., Venegas B., Moreno N., Patricio A., Martínez I., Aguilera J., Limón ID. (2009). The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behaviour in rats with striatal MPP+-lesions. *Neuroscience research*, 65(1)98-106. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.06.001>
- Miana-Mena F. J., Miñoz M. J., Roux S., Ciriza J., Zaragoza P., Brûlet P., Osta R. (2004). A Non-Viral Vector for Targeting Gene Therapy to Motoneurons in the CNS. *Neuro-degenerative diseases*, 1(2-3):101-108. <https://doi.org/10.1159/000080050>
- Morales-Flores, G. (2019). Efecto de la administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica sobre la actividad de enzimas colinérgicas y la memoria espacial en ratas lesionadas con el péptido A β 25-35 en el *septum medial*. Tesis de Licenciatura. BUAP.
- Moreno-Igoa M., Calvo A. C., Penas C., Manzano R., Oliván S., Muñoz M. J., Mancuso R., Zaragoza P., Aguilera J., Navarro X., Osta Pinzolas R. (2010). Fragment C of tetanus toxin, more than a Carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *Journal of molecular medicine (Berlín, Germany)*, 88(3), 297-308. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0556-y>
- Morgado B. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *CIC: Cuadernos de Información y Comunicación*, (10), 221-233. <http://revistas.ucm.es/index.php/CIYC/article/view/CIYC0505110221A>
- Morris R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4)
- Myhrer T. (2003). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain research. Brain research reviews*, 41(2-3), 268–287. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00268-0)

N

- Naldi M, Fiori J, Pistolozzi M, Drake AF, Bertucci C, Wu R, Mlynarczyk K, Filipek S, De Simone A y Andrisano V. (2012). Amyloid β -peptide 25–35 self-assembly and its inhibition: a model undecapeptide system to gain atomistic and secondary structure details of the Alzheimer’s disease process and treatment. *ACS Chemical neuroscience*, 3(11),952-962. <https://doi.org/10.1021/cn3000982>
- Netzahualcoyotzi-Piedra, C. (2009). Efecto del fragmento C-terminal de la toxina tetánica sobre la memoria espacial y el daño neuronal de ratas lesionadas con el péptido A β 25-35. Tesis de Licenciatura. BUAP.

O

- Ortega, L., Calvillo, M., Luna, F., Pérez-Severiano, F., Rubio-Osornio, M., Guevara, J., & Limón, I. D. (2014). 17-AAG improves cognitive process and increases heat shock protein response in a model lesion with A β 25-35. *Neuropeptides*, 48(4), 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2014.04.006>
- O’Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, 34(1), 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- O’Keefe J & Nadel L. 1978. The hippocampus as a cognitive map. *Oxford: University Press; 1978*

P

- Parton, R. G., Ockleford, C. D., & Critchley, D. R. (1987). A study of the mechanism of internalisation of tetanus toxin by primary mouse spinal cord cultures. *Journal of neurochemistry*, 49(4), 1057–1068. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb09994.x>
- Patricio-Martínez, A., Mendieta, L., Martínez, I., Limón, ID., Aguilera, J. (2016). The recombinant C-terminal fragment of tetanus toxin protects against cholinotoxicity by intraseptal injection of β -amyloid peptide (25–35) in rats. *Neuroscience*, 315, 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.066>
- Patricio-Martínez, A., Sánchez-Zavaleta, R., Angulo-Cruz, I., Gutierrez-Praxedis, L., Ramírez, E., Martínez-García, I., & Limón, I. D. (2019). The Acute Activation of the CB1 Receptor in the Hippocampus Decreases Neurotoxicity and Prevents Spatial Memory Impairment in Rats Lesioned with β -Amyloid 25-35. *Neuroscience*, 416, 239–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.001>
- Paxinos G y Watson C, (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edition, United States of America, Academic Press.

- Pérez-Severiano, F., Salvatierra-Sánchez, R., Rodríguez-Pérez, M., Cuevas-Martínez, E. Y., Guevara, J., Limón, D., Maldonado, P. D., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverrí, J., & Santamaría, A. (2004). S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *European journal of pharmacology*, *489*(3), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.03.001>
- Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G., & Cotman, C. W. (1995). Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*, *64*(1), 253–265. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64010253.x>

R

- Ramírez, E., Mendieta, L., Flores, G., & Limón, I. D. (2018). Neurogenesis and morphological-neural alterations closely related to amyloid β -peptide (25-35)-induced memory impairment in male rats. *Neuropeptides*, *67*, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.11.001>
- Ramírez, E., Sánchez-Maldonado, C., Mayoral, M. A., Mendieta, L., Alatríste, V., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2019). Neuroinflammation induced by the peptide amyloid- β (25-35) increase the presence of galectin-3 in astrocytes and microglia and impairs spatial memory. *Neuropeptides*, *74*, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.02.001>
- Reichard LF. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *361*(1473), 1545–1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Roux, S., Colasante, C., Saint Clément C., Barbier, J., Curie T., Girard E., Molgó, J., Brulet, P. (2005). Internalization of GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Molecular and cellular neuroscience*, *30*(1), 79-80. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.05.008>

S

- Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., Talebi, M., Farhoudi, M., & Mahmoudi, J. (2015). Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, *24*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1159/000369101>
- Sánchez-González, A., Mendieta, L., Palafox, V., Candalija, A., Luna, F., Aguilera, J., & Limón, I. D. (2014). The restorative effect of intramuscular

injection of tetanus toxin C-fragment in hemiparkinsonian rats. *Neuroscience research*, 84, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.04.008>

- Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., Polverino de Laureto P., DasGupta BR., Montecucco C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 359(6398), 832-835. <https://doi.org/10.1038/359832a0>
- Schiavo, G., Matteoli, M., & Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological reviews*, 80(2), 717–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.717>
- Scott-Solomon, E., & Kuruvilla, R. (2018). Mechanisms of neurotrophin trafficking via Trk receptors. *Molecular and cellular neurosciences*, 91, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.03.013>
- Sinha, K., Box, M., Lalli, G., Schiavo, G., Schneider, H., Groves, M., Siligardi, G., & Fairweather, N. (2000). Analysis of mutants of tetanus toxin Hc fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Molecular microbiology*, 37(5), 1041–1051. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02091.x>
- Squire L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of learning and memory*, 82(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Stepanichev, M.Y., Onufriev, M.V., Yakovlev, A.A., Khrenov, A.I., Peregud, D.I., Vorontsova, O.N., Lazareva, N.A., Gulyaeva, N.V. 2008. Amyloid-beta (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochem. Int.* 52(6): 1114-1124. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.11.009>

T

- Tran, M. H., Yamada, K., & Nabeshima, T. (2002). Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. *Peptides*, 23(7), 1271–1283. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(02\)00062-1](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(02)00062-1)
- Turton, K., Chaddock, J. A., & Acharya, K. R. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends in biochemical sciences*, 27(11), 552–558. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02177-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02177-1)

V

- Varadarajan S., Kanski J., Aksenova M., Lauderback C., Butterfield D. A. (2001). Different mechanism of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer’s A beta (1-42) and A beta (25-35). *Journal of the American Chemical Society*, 123(24), 5625–5631. <https://doi.org/10.1021/ja010452r>

- Verdier, Y., & Penke, B. (2004). Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Current protein & peptide science*, 5(1), 19–31. <https://doi.org/10.2174/1389203043486937>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR journal*, 55(2), 310–332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>

W

- Wei, G., & Shea, J. E. (2006). Effects of solvent on the structure of the Alzheimer amyloid-beta (25-35) peptide. *Biophysical journal*, 91(5), 1638–1647. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.079186>
- Weissmiller, A. M., & Wu, C. (2012). Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Translational neurodegeneration*, 1(1), 14. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-14>

Z

- Zeng, L., Gao, J., Deng, Y., Shi, J., & Gong, Q. (2019). CZ2HF mitigates β -amyloid 25-35 fragment-induced learning and memory impairment through inhibition of neuroinflammation and apoptosis in rats. *International journal of molecular medicine*, 43(1), 557–566. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3952>

12. ANEXOS

Participación en congreso nacional



LXII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

Fragmento C-terminal de la TeTx no modifica la memoria espacial de ratas con el A β 25-35

Rivera Olivares Patricia (Estudiante de licenciatura)¹, Aguilera Avila José³, Patricio Martínez Aleidy^{1,2}, Limón Pérez de León Ilhuicamina Daniel¹

Querétaro

11-15 de Agosto del 2019