



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE SULFATO
DE ZINC EN EL DESEMPEÑO DE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA
MORFOLOGÍA DEL HIPOCAMPO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA PRESENTA:

ANA KAREN RAMÍREZ REYES

DIRECTOR: **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA**

REVISORA: **DRA. LAURA ELISA RAMOS LANGUREN**

SINODALES: **DRA. ALEJANDRA EVELYN RUIZ CONTRERAS**

DR. CESAR CASASOLA CASTRO

DRA. KARINA SIMÓN ARCEO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE, 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

1. Resumen.....	7
2. Introducción	8
2.1. Neurodegeneración	8
2.1.1. Definición.....	8
2.1.2. Mecanismos de neurodegeneración	8
3. Antecedentes	11
3.1. Alteraciones cognitivas y periféricas en los procesos neurodegenerativos...11	
3.2. Déficits en el procesamiento olfativo.....13	
3.2.1 Procesamiento de la información olfativa.....	14
3.3. Déficits en memoria espacial.....16	
3.3.1. Procesamiento de la información espacial.....	19
3.4. Participación del sistema nervioso periférico en la neurodegeneración	20
3.5. La teoría neurotrófica y los procesos neurodegenerativos.....23	
4. Justificación.....	26
5. Objetivos	27
5.1. Objetivo general	27
5.2. Objetivos específicos	27
6. Hipótesis.....	27
7. Materiales y métodos	28
7.1. Animales	28
7.2. Evaluación de la ejecución en el laberinto de agua de Morris	28
7.3. Lesión de la mucosa olfatoria.....	29
7.4. Análisis histológico	30
7.4.1. Evaluación de la morfología neuronal en el hipocampo.....	30
7.4.2. Evaluación de la morfología de la mucosa olfatoria	31
7.5. Análisis estadístico.....	31

8. Resultados	33
8.1. Efecto de la administración intranasal de ZnSO₄	33
8.2. Desempeño en memoria espacial	35
8.2.1. Entrenamiento	35
8.2.2. Prueba de evocación.....	36
8.2.3. Prueba de evocación después de la administración intranasal con ZnSO ₄	37
8.3. Análisis morfológico del área CA3 del hipocampo	38
8.3.1. Área del soma	38
8.3.2. Número de intersecciones.....	39
8.3.3. Longitud dendrítica total	40
9. Discusión.....	42
10. Conclusiones	45
11. Referencias	46
12. Apéndices.....	52
12.1. Apéndice 1: Laberinto de agua de Morris en ratas.....	52

Para Nico y Sergio, por ser incondicionales.

Por estos 26 años juntos

Reconocimientos

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por confiar en mí y permitirme pensar libremente. Por cambiar mi visión de la ciencia. Por ser un gran científico y un excelente ser humano.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos, por la ayuda técnica otorgada, pero sobre todo por las discusiones científicas y las observaciones siempre precisas. Por ser un excelente ejemplo de disciplina y dedicación.

A la Dra. Margarita Gómez Chavarín por la ayuda técnica otorgada en el desarrollo del presente trabajo. Por tener siempre la disposición de compartir conmigo un poco de su experiencia.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por su ayuda en el área de microscopia. Sin duda todo hubiera sido más difícil sin su apoyo.

A mi revisora y sinodales: Dra. Laura Ramos Languren, Dra. Karina Simón Arceo, Dr. César Casasola Castro y Dra. Alejandra Ruiz Contreras. Por mejorar este trabajo con sus valiosos comentarios y observaciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme y permitirme lidiar cada día con mi ignorancia. Por darme la oportunidad de descubrir el camino de la ciencia.

A todos los mexicanos que con sus impuestos contribuyen a mantener nuestra Universidad.

Agradecimientos

A Nico y Sergio por ser el mejor ejemplo de honestidad, constancia y trabajo. Nico, gracias por ser la mamá más cariñosa que pude tener, por sorprenderme cada día con tu entereza, por estar ahí siempre. Papá, gracias por permitirme aprender de ti, por confiar en mí y por respetar mis decisiones. Cada uno de mis logros, será siempre dedicado a ustedes.

A Nancy, porque has cuidado de mí de muchas formas, por tus “malos” chistes, por sonreír siempre. A Miguel, por todos los buenos recuerdos de mi niñez: las excursiones juntos, los patines nuevos, las paletas de lápiz a la salida del kínder, etc, etc. A Liz por crecer conmigo, por ser mi amiga y mi hermana.

A Karla, Paola, Emiliano y María Elena, por ser tan espontáneos. Por recordarme la importancia de la felicidad genuina. Por sorprenderme con sus preguntas y porque al fin me convenzo de que sí, llegaron a nuestras vidas para hacernos sonreír. Los quiero mucho.

A Gaby por ser mi complemento, por compartir risas y lágrimas. Gracias por tu ternura y tu complicidad. Te quiero Gabriela Lizbeth.

A Mary Octavia por ser incondicional, por motivarme a conseguir mis objetivos. Por escuchar sin juzgar. Te quiero Mary.

A Ruy Islas por todas las pláticas, las peleas y la música compartida. Porque has estado conmigo en los días realmente difíciles. Aunque no parezca, sí te quiero Ruy.

A Ale “pingüino”, por ser una parte fundamental en el inicio de este proyecto. Por ofrecerme tu ayuda, pero sobre todo por contagiarme siempre de tu amor y dedicación por la ciencia.

A Alex Chill por haber iniciado este camino conmigo, por las discusiones de filosofía y los cafés con malvaviscos.

A los viejos NETs: Gaby, Octavia, Arely, Ingrid, Diego, Rodrigo (R), Aline, Israel y Chucho. Por iniciar el camino de la ciencia conmigo. Por todas las pláticas, las risas y los congresos. Por hacer de Cancún, Nueva York y San Diego lugares inolvidables. Hoy nuestros caminos son diferentes pero grandes cosas nos esperan.

Al laboratorio B220: Cinthia, Carla, Christian, Luis, y Vicente. Por los comentarios y observaciones en cada seminario. Por animar el trabajo de cada día con pláticas y risas.

A Itztli y Zan por confiar en mí, por sus enseñanzas dentro del laboratorio. Por los cafés y las pláticas que hemos compartido.

A Margarita por ser tan linda conmigo, por compartirme los “tips” de la histología. Por todo tu afecto.

A Jesús por los Km que hemos re-corrido juntos. Por enseñarme un poco de bacterias, insectos, violetas, pingüinos, orquídeas y cerezas. Por tu paciencia y dedicación dentro del laboratorio. Por nutrir mi perspectiva de la ciencia.

A Gabriel por confiar en mí y permitirme desarrollar mis ideas. Por incentivar mi creatividad y mi criterio. Por ser un apoyo en los momentos más inesperados de la vida. Porque te respeto como investigador y como ser humano.

A ti mi fiel compañero de risas y pláticas, por ser incondicional. Por enseñarme a contemplar las estrellas en los días nublados. Por dejar en mi memoria momentos inolvidables. Eres el color amarillo mango. “Te amaré y después... te amaré”

1. Resumen

La neurodegeneración se caracteriza por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales específicas y es distintiva de enfermedades como Parkinson y Alzheimer. En general, éstas se encuentran precedidas por la presencia de síntomas prodrómicos de disautonomía periférica que avanzan años antes de que se manifiesten las alteraciones patognomónicas de la enfermedad. Lo anterior, hace factible la posibilidad de que la neurodegeneración central sea secundaria a un proceso degenerativo periférico, el cual conduciría a la pérdida del soporte trófico provisto por el cuerpo al sistema nervioso. Uno de los síntomas prodrómicos con mayor incidencia es la disfunción olfativa. La información olfativa es transducida por el epitelio olfativo, y posteriormente enviada hacia estructuras centrales que la relevan hacia el área CA3 del hipocampo, estructura clave en el procesamiento de la memoria espacial. De esta forma, alteraciones en la memoria espacial podrían observarse en individuos anósmicos, como consecuencia de la pérdida de la integridad morfo-funcional de la mucosa olfatoria. Esta pérdida podría provocar un proceso de neurodegeneración anterógrado que afectase, por desaferentación, los relevos de la vía olfativa. Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo general del presente trabajo fue evaluar los efectos de la privación olfativa periférica causada por degeneración inducida, sobre la integridad morfo-funcional hipocampal y las implicaciones de éstos posibles cambios sobre la memoria espacial. Para dicho propósito, un grupo de ratones recibió instilaciones nasales de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) durante 14 días; se sabe que este tratamiento lesiona transitoriamente la mucosa olfatoria. También, se contó con un grupo control sin administración farmacológica y un grupo vehículo con instilaciones nasales de agua desionizada. Previo a la administración farmacológica, todos los grupos fueron entrenados y probados en el laberinto de agua de Morris, para evaluar la memoria espacial. Una vez terminados los 14 días de instilación, todos los grupos fueron sometidos a una prueba de ejecución, con la finalidad de evaluar si la memoria espacial fue afectada por el procedimiento de denervación olfativa. Los estudios conductuales fueron complementados con análisis histológicos dirigidos a corroborar la integridad del epitelio olfativo en los tres grupos. Los cambios anatómicos en el hipocampo se evaluaron combinando técnicas de impregnación argéntica y morfometría. Nuestros resultados mostraron que a pesar de que el tratamiento con $ZnSO_4$ causó daños en el epitelio olfativo, no se observaron modificaciones morfológicas en las neuronas piramidales del área CA3 ni déficits en el desempeño de la memoria espacial de los animales tratados. En conclusión, el tratamiento de denervación utilizado, fue insuficiente para provocar cambios morfológicos en el hipocampo. En futuros experimentos, será necesaria una evaluación morfológica de los diferentes relevos de la vía olfativa, así como la estandarización de un protocolo de administración más prolongado que logre emular el proceso degenerativo.

2. Introducción

El envejecimiento trae consigo cambios en la morfología y tamaño del cerebro, así como deterioro cognitivo (Peters, 2006), al mismo tiempo que es un factor de riesgo para la aparición de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson y Alzheimer.

2.1. Neurodegeneración

2.1.1. Definición

La neurodegeneración se caracteriza por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales específicas en el sistema nervioso (Lin y Beal, 2006; Ross y Poirier, 2004) y es distintiva de enfermedades como Parkinson y Alzheimer. Cuando este proceso afecta estructuras centrales se asocia con deterioro cognitivo, que posteriormente puede conducir a la demencia (Aarsland, Bronnick y Williams-Gray, 2010; Laczó, Vlcek y Vyhnalek, 2009). Los déficits en la función cognitiva ocurren como parte normal del envejecimiento, sin embargo, existen factores de riesgo genéticos y ambientales (p. ej. síndrome de Down, exposición a pesticidas, exposición a metales pesados, etc.) que pueden acelerarlos (Brown, Lockwood y Sonawane, 2005). A la fecha, se han propuesto una serie de mecanismos que se presume, dan cuenta de la etiopatogenia de los procesos neurodegenerativos en sus distintas manifestaciones. En la siguiente sección se revisarán dichas ideas.

2.1.2. Mecanismos de neurodegeneración

Una característica presente en diversas enfermedades neurodegenerativas es la aparición de agregados de proteínas tóxicas que se propone, dan paso a la muerte neuronal (Ross y Poirier, 2004). El proceso de agregación ocurre como parte del funcionamiento celular normal y es producido principalmente por un aumento en la tasa de oligomerización, así como por cambios conformacionales de las proteínas. Sin embargo, cuando las

concentraciones de proteína aumentan excesivamente, estos agregados llegan a ser tóxicos e irremovibles (Philo y Arakawa, 2009).

Las proteínas que conforman estos agregados, forman parte del funcionamiento celular normal. Por ejemplo, la alfa-sinucleína, se encarga de regular la liberación de neurotransmisores en las terminales sinápticas (Bendor, Logan y Edwards, 2013). En el caso de la enfermedad de Parkinson, sin embargo, se cree que los agregados de alfa-sinucleína ocasionan la muerte neuronal como consecuencia de un aumento de la permeabilidad de la membrana celular al Ca^{+2} , lo que eleva su concentración hasta alcanzar niveles intracelulares tóxicos (Furukawa et al., 2006).

La acumulación anormal de proteínas dentro de las células, está influenciada por un funcionamiento inadecuado del sistema ubiquitina- proteosoma (Ross y Pickart, 2004); este sistema regula las concentraciones proteicas dentro del núcleo y el citoplasma (Dantuma y Bott, 2014). Para que se lleve a cabo el proceso de degradación, una o varias moléculas del polipéptido ubiquitina se unen covalentemente a proteínas dañadas o malformadas (Ciechanover y Brundin, 2003). Múltiples secuencias de ubiquitinación dan lugar a la formación de una cadena de poliubiquitina, la cual funciona como una señal para que el proteosoma efectúe la degradación (Dantuma y Bott, 2014).

Aunado a lo anterior, el proceso degenerativo ha sido atribuido a estrés oxidante y disfunciones mitocondriales (Redmann, Darley-Usmar y Zhang, 2016). Como parte de la función metabólica normal de un organismo, el oxígeno es esencial en el proceso de respiración celular que ocurre en las mitocondrias y que tiene como finalidad la obtención de energía en forma de ATP (Hansberg, 2002). La producción de energía se lleva a cabo mediante reacciones de óxido-reducción, en las cuales se generan como productos, especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS, por sus siglas en inglés) (Zhang y Darley-Usmar, 2012).

Las ROS (p. ej. superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrógeno, etc.) son radicales libres que tienen como componente al oxígeno; átomo altamente reactivo debido a que posee al menos un electrón no apareado en su órbita más externa (Uttara, Singh, Zamboni y Mahajan, 2009). Las ROS pueden ocasionar mutaciones en el ADN mitocondrial, dando lugar a un decremento en la producción de ATP y trayendo como consecuencia alteraciones en el funcionamiento normal de la célula (Calabrese, Scapagnini y Giuffrida

Stella, 2001). La generación de ROS también puede ser promovida por estrés oxidante, definido como un desbalance entre la producción de éstas y las defensas antioxidantes, causando muerte celular por apoptosis (Mammucari y Rizzuto, 2010).

A la par, las ROS son liberadas junto con citosinas e interleucinas por la microglia, como parte de la respuesta inmune del sistema nervioso central (SNC), actuando a manera de agentes pro-inflamatorios (Witte, Geurts, Vries, Valk y Horssen, 2010). Esta respuesta inmune es conocida con el nombre de neuroinflamación, y ocurre como consecuencia a un daño en el tejido nervioso, con la finalidad de regenerarlo y evitar alteraciones en otras áreas del cerebro (Carson, Thrash y Walter, 2006). La liberación de agentes pro-inflamatorios favorece el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo el paso a leucocitos para así beneficiar la respuesta inmune (Chen, Zhang y Huang, 2016). La respuesta neuroinflamatoria actúa como un mecanismo neuroprotector dentro del cerebro, sin embargo, cuando esta respuesta se mantiene de manera crónica, trae como consecuencia la muerte neuronal derivada de la sobreproducción de ROS (Witte et al., 2010).

No obstante, la aceptación que tienen estas hipótesis como las bases del mecanismo etiopatogénico de los procesos neurodegenerativos, las medidas terapéuticas propuestas con base en ellas, no han logrado resolver la progresión de los mismos. Esto sugiere que dichas explicaciones son insuficientes para proveer de un esclarecimiento satisfactorio sobre el problema que pretenden modelar. En este contexto, estudios recientes apoyan la posibilidad de que los procesos neurodegenerativos pudiesen tener su origen en el sistema nervioso periférico (Braak et al., 2003; Braak, Vos, Bohl y Tredici, 2006). Corroborar esta posibilidad será el objetivo central del presente trabajo.

3. Antecedentes

3.1. Alteraciones cognitivas y periféricas en los procesos neurodegenerativos

Una consecuencia notable del proceso neurodegenerativo es la pérdida progresiva de las funciones cognitivas, la cual incluye déficits en aprendizaje, atención y memoria (Aarsland et al., 2010; McKinlay, Grace, Dalrymple-Alford y Roger, 2010). Sin embargo, las alteraciones que trae consigo el proceso degenerativo no se limitan a las de tipo cognitivo. Actualmente se sabe que pacientes que desarrollan enfermedades de Parkinson o de Alzheimer, presentan una gama de síntomas muy amplia, que se extienden más allá del SNC; estos síntomas incluyen fallas en los sistemas sensoriales y manifestaciones que involucran al sistema autónomo (Yu et al., 2013; Palma y Kaufmann, 2014) (Tabla 1).

Las alteraciones que ocurren a nivel del sistema nervioso periférico (SNP), han sido consideradas como una consecuencia del daño en el SNC. Sin embargo, en años recientes se ha propuesto que la degeneración periférica puede preceder u ocurrir de manera simultánea a las alteraciones centrales que acompañan al proceso neurodegenerativo. Un ejemplo de ello es la presencia de disfunción olfativa en pacientes que se encuentran en etapas tempranas de enfermedades como Parkinson y Alzheimer.

Tabla 1. Sintomatología presente en enfermedades neurodegenerativas. Modificada de Chaudhuri, Odin, Antonini y Martínez, 2011.

Síntomas		
Autónomos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disfunción sexual ▪ Hipotensión ortostática 	
	Entéricos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disfagia ▪ Estreñimiento ▪ Vómito ▪ Nauseas ▪ Reflujo ▪ Incontinencia fecal
Neurofisiológicos	Trastornos del sueño	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Somnolencia diurna excesiva ▪ Insomnio ▪ Trastornos respiratorios del sueño
	Sensoriales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disfunción olfativa
Neuropsiquiátricos	Trastornos del ánimo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Depresión ▪ Ansiedad ▪ Apatía
Neuropsicológicos	Deterioro cognitivo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Memoria espacial ▪ Memoria de trabajo ▪ Atención ▪ Aprendizaje ▪ Funciones ejecutivas ▪ Demencia

3.2. Déficits en el procesamiento olfativo

Uno de los síntomas prodrómicos presente en las enfermedades de Parkinson y Alzheimer es la disfunción olfativa (Doty, 2007). Ésta se caracteriza por deficiencias en la detección, identificación y discriminación de los olores (Kovács, 2004; Doty, 2012). La detección, se refiere al umbral más bajo en que un odorante puede activar a los receptores olfativos. La habilidad para nombrar un olor se conoce como identificación. La discriminación, por su parte, se refiere a la habilidad no verbal para distinguir entre diferentes olores (Kovács, 2004; Lotsch, Reichmann y Hummel, 2008). La detección depende del sistema olfativo periférico, mientras que la identificación y discriminación requieren de control cognitivo y de la activación de estructuras olfativas centrales (Bohnen y Muller, 2013).

La disfunción olfativa puede ser dividida en hiposmia y anosmia. La primera, se refiere a una sensibilidad disminuida para la detección de olores, casi siempre como consecuencia de enfermedad nasal. La anosmia, por su parte se define como la imposibilidad para detectar odorantes, y se encuentra asociada a daños en el epitelio olfatorio (Fuentes et al., 2011).

Doty, Reyes y Gregor (1987) evaluaron a un total de 34 pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer. Con base en los resultados obtenidos en una tomografía computarizada, un electroencefalograma, evaluaciones neurológicas y neuropsicológicas, se dividió a los pacientes en 3 etapas diferentes de acuerdo al avance de la enfermedad. Tanto a los pacientes como a sus respectivos controles, los cuales estaban pareados por edad, género y raza, se les aplicó una prueba de identificación de olores (UPSIT) y una prueba de umbral de detección. La primera consistió en la presentación de 40 olores diferentes que debían ser identificados por los sujetos. En la prueba de umbral de detección, se presentaban dos botellas de manera aleatoria, una con alcohol feniletílico disuelto al 70% y otra únicamente con el solvente, la tarea de los sujetos era reportar cuál de las dos botellas les provocaba la sensación de olor más fuerte. Los pacientes con Alzheimer mostraron deficiencias en detección e identificación olfativa, con respecto al grupo control. Ninguna de las alteraciones tuvo correlación con la etapa de la enfermedad en la que se encontraban los pacientes, sugiriendo que la disfunción olfativa está presente desde etapas tempranas del proceso degenerativo.

A favor de esta hipótesis, en otro estudio se evaluaron cerebros *postmortem* de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer. Se caracterizó la etapa de la enfermedad en la que se encontraba cada uno de los pacientes de acuerdo con Braak y Braak (1991) y con base en los criterios del Instituto Nacional de Envejecimiento (NIA-RI, por sus siglas en inglés). Posteriormente se llevaron a cabo inmunohistoquímicas para evaluar los ovillos neurofibrilares (NFT) en estructuras como bulbo olfatorio, núcleo olfativo anterior, amígdala anterior, corteza periamigdalóide y corteza entorrinal, las cuales reciben aferencias directas desde el bulbo olfatorio. Los resultados mostraron que los pacientes en etapas tempranas de la enfermedad presentan los ovillos neurofibrilares primordialmente a nivel del bulbo olfatorio y del núcleo olfativo anterior, sugiriendo que la disfunción olfativa observada en etapas tempranas del proceso neurodegenerativo se encuentra asociada a alteraciones del bulbo olfatorio y del núcleo olfativo anterior más que a estructuras corticales asociadas encargadas de la integración y procesamiento de la información olfativa. En segundo lugar, sugiere que el daño temprano visto en el bulbo olfatorio podría estar relacionado con alteraciones a nivel de receptores olfativos periféricos en el epitelio olfativo (Kovács, Cairns y Lantos, 2001).

3.2.1 Procesamiento de la información olfativa

El epitelio olfativo está constituido por dos capas, la mucosa olfatoria y la lámina propia. La mucosa olfatoria, posee un epitelio columnar pseudoestratificado integrado por neuronas receptoras olfativas (ORNs por sus siglas en Inglés), células de soporte, células con microvellosidades y células basales (Shiple, Ennis y Puche, 2004). La lámina propia se encuentra ubicada por debajo de la mucosa olfatoria y en ella se localizan las glándulas de Bowman, las cuales que extienden hasta el interior de la cavidad nasal (Fuentes et al., 2011). La cavidad nasal contiene una serie de estructuras formadas por hueso, recubiertas por epitelio olfativo, llamadas conjuntamente huesos turbinados nasales, divididos a su vez en endoturbinados y ectoturbinados, por su ubicación hacia el interior o exterior del septum nasal, respectivamente (Fig.1) (Shiple et al., 2004).

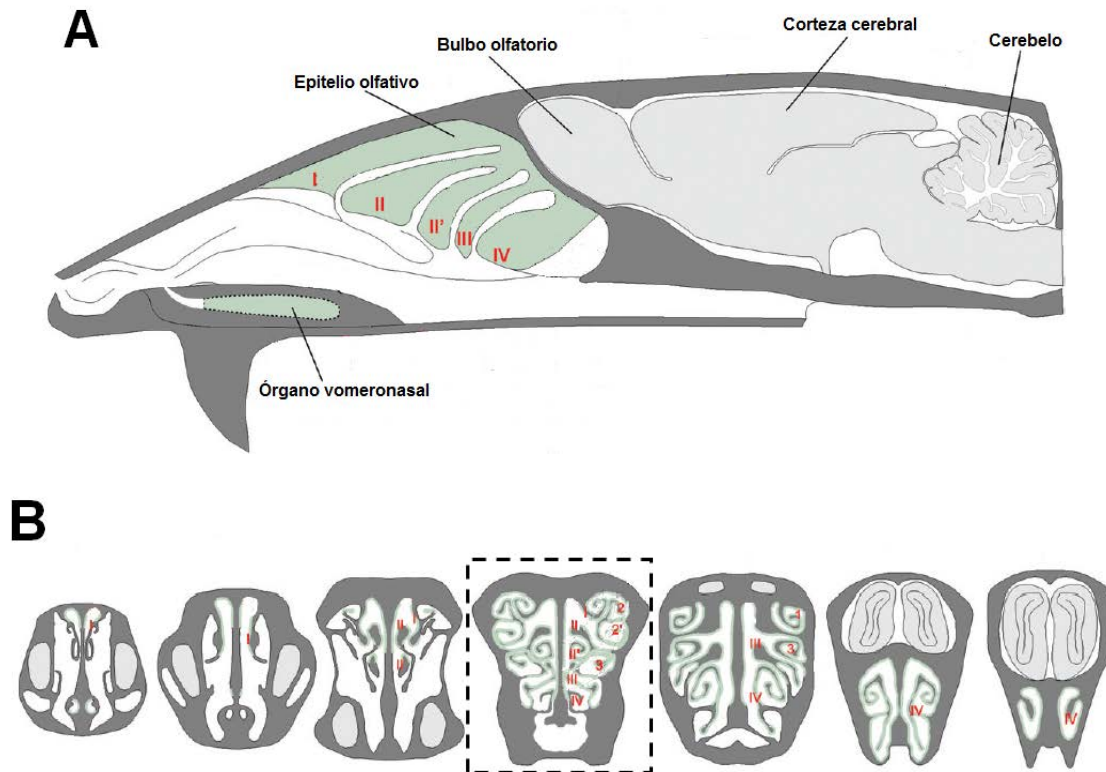


Figura 1. (A) Vista sagital de la cavidad nasal y del encéfalo de ratón en la que se muestra la ubicación relativa del epitelio olfativo. (B) Cortes coronales del epitelio olfativo a distintos niveles de la cavidad nasal, señalando en color rojo los huesos endoturbinados (I-IV) y ectoturbinados (1-3). El corte enmarcado con líneas punteadas muestra el nivel de la cavidad nasal en donde se encuentra la mayor superficie de la misma cubierta por epitelio olfativo. Modificada de Shipley et al., 2004.

Las ORNs del epitelio olfativo son células sensoriales bipolares que funcionan como receptores olfativos. Los axones de dichas neuronas se agrupan para formar el nervio olfativo. Ellos convergen en los glomérulos del bulbo olfatorio para hacer sinapsis con las dendritas de las células mitrales y en penacho (Kosaka y Kosaka, 2009). El conjunto de los axones de estas últimas células se agrupan para formar el tracto olfatorio, vía responsable de transmitir la información procedente del bulbo olfatorio hacia la corteza olfativa primaria. El tubérculo olfatorio, el núcleo olfativo anterior, la corteza piriforme, la amígdala y la corteza entorrinal se conocen con el nombre de corteza olfativa primaria; estas estructuras reciben proyecciones directas del bulbo olfatorio (Fuentes et al., 2011). Cada una de estas estructuras a su vez, envía sus aferencias hacia otras partes del cerebro, que en conjunto dan lugar a la corteza olfativa secundaria (Fig. 2). De las regiones cerebrales que se presume forman la corteza olfativa secundaria, la corteza

entorrinal envía proyecciones hacia el cuerno de Ammon 3 (CA3) hipocampal, estableciendo una vía de comunicación entre en epitelio olfativo y el hipocampo, y con ello, la posibilidad de que la información olfativa pudiese alterar la memoria espacial.

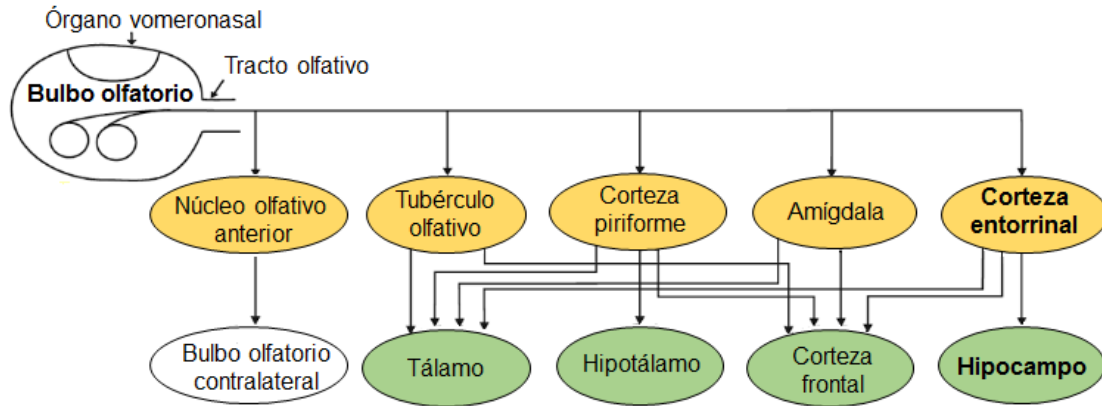


Figura 2. Proyecciones enviadas desde el bulbo olfatorio hacia diferentes áreas del cerebro. En amarillo, las regiones que integran la denominada “corteza olfativa primaria”. En verde las áreas que en conjunto han sido nombradas como “corteza olfativa secundaria”. Modificado de Bossomaier, 2012.

3.3. Déficit en memoria espacial

Aunado a la presencia de disfunción olfativa, los procesos neurodegenerativos pueden asociarse con déficit en la memoria espacial. Ésta se define como la habilidad de un sujeto para codificar, almacenar y recordar información referencial acerca del ambiente y los objetos dentro de él (Madl et al., 2015). Las representaciones espaciales pueden ser categorizadas de acuerdo al marco de referencia utilizado. Así, en la navegación egocéntrica, el sujeto recurre a información derivada de su apreciación de las distancias y ángulos en los que se encuentran los objetos dentro del ambiente, en función de su posición. Por el contrario, en la navegación allocéntrica, el sujeto emplea una representación espacial flexible, relativa a un conjunto de señales ambientales que es independiente de la posición actual del sujeto (Laczó et al., 2009; Madl et al., 2015). Si bien ambas estrategias son utilizadas para formar representaciones espaciales, es más frecuente que se haga uso de la navegación allocéntrica cuando el sujeto se encuentra en ambientes más complejos (Wood y Chan, 2015).

Diferentes estudios, han reportado que pacientes que padecen las enfermedades de Parkinson o Alzheimer, muestran déficits de la memoria espacial incluso en etapas tempranas del proceso neurodegenerativo (Muslimovic, Post, Speelman y Schmand, 2005; McKinlay et al., 2010; Kalová, Vlcek, Jarolímová y Bures, 2005). En este sentido, Kalová et al. (2005) evaluaron a un grupo de 11 pacientes con enfermedad de Alzheimer y 10 sujetos controles. Ambos grupos realizaron una prueba de memoria espacial (*Hidden Goal Task*), en dos versiones: una versión en espacio real y otra computarizada. La versión en espacio real, se llevó a cabo en un área circular cerrada. Alrededor se colocaron 8 punteros, mediante los cuales podían proyectarse 8 patrones diferentes de luz que fungían como señales de referencia visual.

Para llevar a cabo la versión computarizada, previo al inicio de los ensayos, al sujeto se le mostraba la posición de inicio marcada sobre la circunferencia como un círculo pequeño, las señales visuales representadas por arcos de color rojo y verde, y la posición objetivo marcada como un círculo pequeño al interior de la circunferencia (Fig. 3-A). El objetivo de la tarea consistió en localizar la posición blanco, que no era visible para los participantes, utilizando como referencia espacial la posición de inicio (estrategia egocéntrica), las señales visuales (estrategia allocéntrica) o ambas (Fig. 3-B). Entonces, se les explicó que la posición objetivo cambiaría en cada ensayo de manera aleatoria, pero guardaría siempre la misma distancia y dirección con respecto a la posición de inicio y a las señales visuales. Una vez que el sujeto hacía su elección, la posición real se mostraba en la pantalla durante 5s. Para la versión en espacio real, la posición objetivo mantuvo la misma relación espacial con las señales visuales y la posición de inicio.

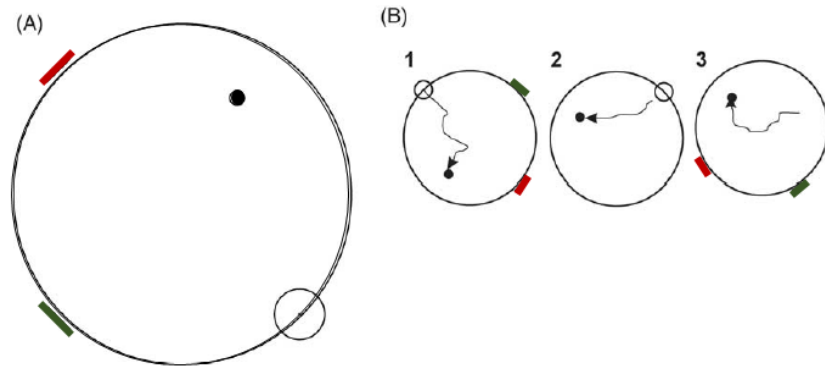


Figura 3. (A) Imagen de la computadora antes del primer ensayo. En ella se muestra la posición objetivo, las señales visuales y la posición de inicio. (B) Imagen representativa de los 3 diferentes tipos de ensayo: estrategia alocéntrica (B-3), estrategia egocéntrica (B-2) y estrategia alocéntrica-egocéntrica (B-1). Modificado de Kalová et al., 2005.

Los resultados revelaron que en ambas versiones de la tarea, el grupo control mostró un desempeño significativamente mejor, con respecto al grupo de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer. Como se observa en la Fig. 4, el grupo control estuvo más cerca de la posición objetivo. Es importante señalar que las principales diferencias entre grupos se observaron en los ensayos en los que únicamente estaban visibles las señales visuales, es decir, cuando debía emplearse una estrategia espacial alocéntrica.

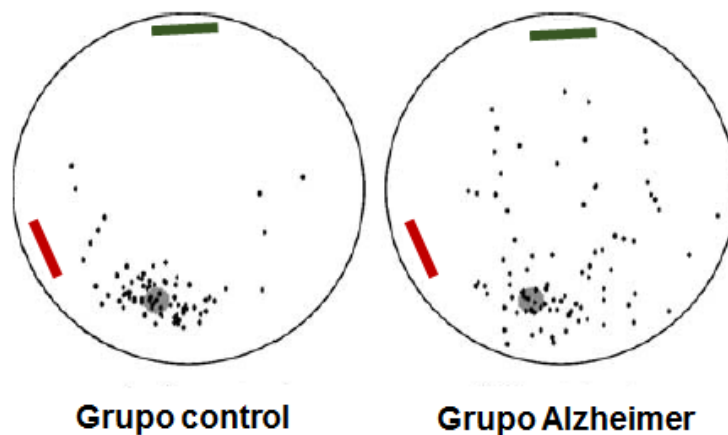


Figura 4. Imagen representativa del desempeño de un grupo de individuos control y otros afectados por enfermedad de Alzheimer. Ambos grupos empleando una estrategia espacial alocéntrica. Las señales visuales representadas por líneas en color rojo y verde, la posición objetivo se encuentra señalada en color gris. Modificado de Kalová et al., 2005.

3.3.1. Procesamiento de la información espacial

Se sabe que una estructura clave en el procesamiento de la información espacial es el hipocampo. Éste se encuentra conformado por cinco regiones denominadas como CA1, CA2, CA3, CA4 y giro dentado (Olivares, Juárez y García, 2015). El hipocampo contiene células dedicadas a formar una representación dinámica del espacio y de la posición relativa que guarda en él, el sujeto (Moser, Kropff y Moser, 2008). Las así llamadas células de lugar son neuronas piramidales que se encuentran localizadas en el CA1 y CA3, aunque se ha propuesto que las representaciones espaciales son generadas de manera predominante en el CA3 (Moser et al., 2008). Las células piramidales del área CA3 reciben aferencias de las fibras musgosas de las células granulares en el giro dentado, de los axones de la vía perforante y de conexiones recurrentes de las colaterales de Schaffer (Neves, Cooke y Bliss, 2008).

Para que se lleve a cabo el procesamiento de la información espacial, axones provenientes de la capa II de la corteza entorrinal envían proyecciones a las células granulares del giro dentado a través de la vía perforante. En turno, las neuronas granulares transfieren la información hacia las células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas. Finalmente, los axones de CA3 envían la información hacia las neuronas piramidales de CA1, mediante las colaterales de Schaffer (Deng, Aimone y Gage, 2010; Olivares et al., 2015, Nakazawa et al., 2002). Asimismo, el CA3, recibe aferencias recurrentes desde las colaterales de Schaffer, ipsi y contralateralmente, así como proyecciones directas desde la capa II de la corteza entorrinal por medio de la vía perforante (Olivares et al., 2015) (Fig. 5). La existencia de aferencias colaterales recurrentes dentro del CA3 ha permitido plantear su participación de manera preponderante en la memoria espacial. Esta característica permite que el CA3 funcione como una red de memoria asociativa que sea menos susceptible a modificaciones (Moser et al., 2008; Nakazawa et al., 2002).

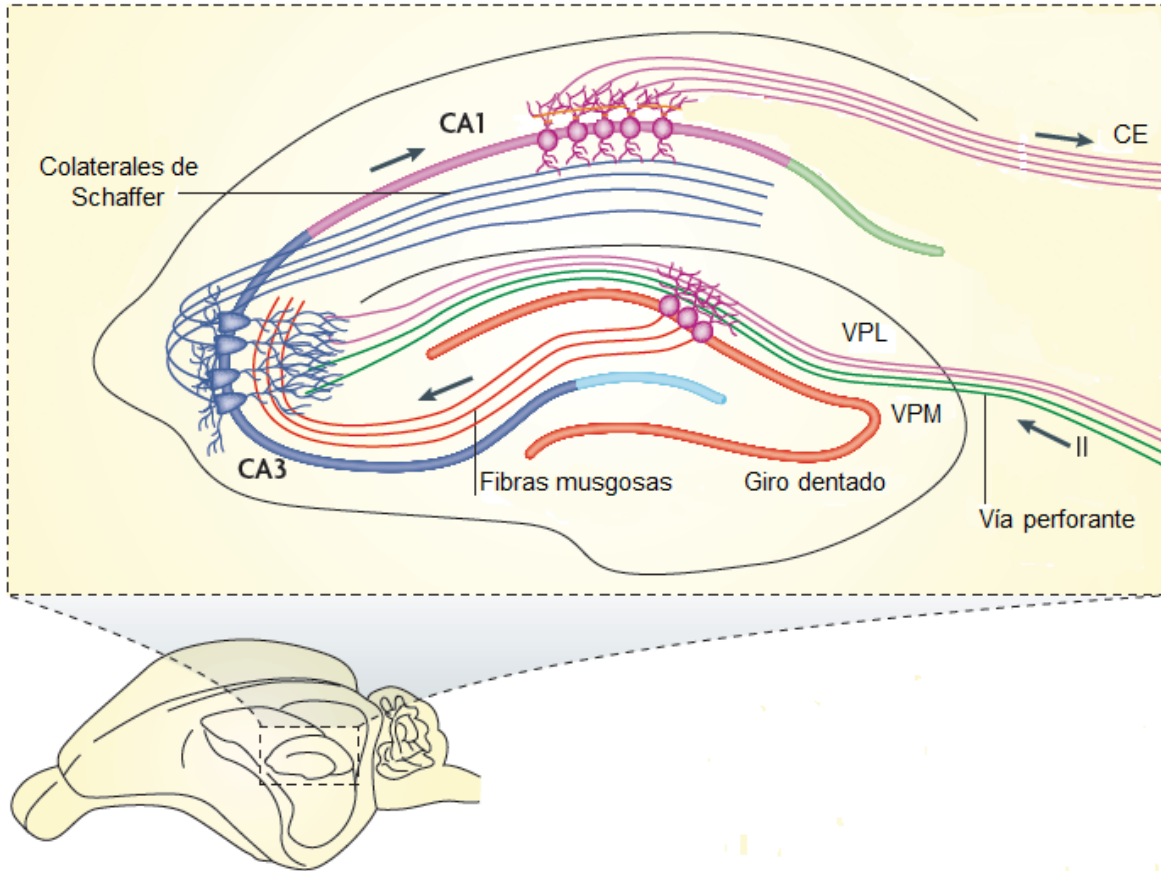


Figura 5. Vista sagital del encéfalo de la ratona que muestra la vía de procesamiento de la información espacial en el hipocampo. CE: corteza entorrinal; VPL: vía perforante lateral; VPM: vía perforante medial. Modificado de Deng et al., 2010.

3.4. Participación del sistema nervioso periférico en la neurodegeneración

Para fortalecer la noción de que elementos del sistema nervioso periférico pudiesen estar relacionados con, y de hecho anteceder a los procesos de neurodegeneración central, Braak y colaboradores llevaron a cabo dos experimentos centrales. El primero de ellos tuvo como objetivo evaluar si el proceso degenerativo ocurre de manera aleatoria o si sigue una secuencia predeterminada. Para poner a prueba ambas hipótesis, Braak et al. (2003) evaluaron la presencia de agregados de α -sinucleína en cerebros *postmortem* de 110 pacientes con enfermedad de Parkinson y 58 sujetos controles. Entre las áreas evaluadas se encontraban bulbo olfatorio, tracto olfatorio, núcleo motor dorsal del nervio vago (dm), sustancia nigra, hipocampo (CA2), áreas de asociación sensorial y corteza prefrontal (AS/CxP). Los resultados mostraron que diferentes estructuras pueden ser

afectadas a diferentes tiempos durante el curso de la enfermedad. Con base en ello, Braak et al. (2003) propusieron que los agregados proteicos en etapas tempranas, se manifiestan a nivel del bulbo y/o tracto olfatorio, así como en el núcleo dorsal del nervio vago. Durante etapas intermedias, las principales alteraciones se observan en sustancia *nigra*, mientras que las áreas corticales únicamente se ven afectadas en etapas tardías de la enfermedad (Tabla 2).

Tabla 2. Áreas afectadas en el curso de la enfermedad de Parkinson.

Etapa Parkinson n=110	Bulbo y/o tracto olfatorio	dm	Sustancia <i>nigra</i>	Hipocampo (CA2)	AS/CxP
1 (n=21)	40%*	100%	5%*	-	-
2 (n=13)	82%*	100%	-	-	-
3 (n=24)	100%*	100%	100%	25%	-
4 (n=24)	100%*	100%*	100%	100%	-
5 (n=17)	100%*	100%*	100%	100%	100%
6 (n=11)	100%*	100%*	100%	100%*	100%

Porcentaje de pacientes que mostró agregados de α -sinucleína por área y de acuerdo a la etapa de la enfermedad en la que estaban clasificados. Para algunos casos se muestra la ausencia de agregados proteicos (-). Para algunas estructuras, el total de la muestra no fue evaluada (*). dm: núcleo motor dorsal del nervio vago; AS/CxP: áreas de asociación sensorial y corteza prefrontal. Modificada de Braak et al., 2003.

En la segunda serie de experimentos, Braak et al. (2006) evaluaron la presencia de agregados de alfa-sinucleína tanto en el plexo submucoso de Meissner, como en el plexo mientérico de Auerbach de muestras gástricas de cinco pacientes diagnosticados con enfermedad de Parkinson con sus respectivos controles. Los autores documentaron que las muestras de los cinco pacientes fueron positivas para los agregados proteicos. Más interesante aún fue el hecho de que los pacientes que se encontraban en etapas

tempranas de la enfermedad, no mostraron evidencia de agregados de alfa-sinucleína en las estructuras del sistema nervioso central evaluadas (Tabla 3).

Aunque no está clara la razón por la cual la alfa-sinucleína se agrega a las células nerviosas periféricas ni los mecanismos por los cuales alteraciones periféricas podrían traducirse tardíamente en procesos neurodegenerativos, Braak et al. (2006) propusieron que el nervio vago podría transportar proteínas tóxicas desde sus blancos periféricos hasta su sitio de origen.

Tabla 3. Datos clínicos y neuropatológicos de los casos estudiados.

Caso	Etapas	ENS	dmX	SN	mes	neo
1	2	+	+	-	-	-
2	3	+	+	+	-	-
3	4	+	+	+	+	-
4	5	+	+	+	+	+
5	5	+	+	+	+	+
6	0	-	-	-	-	-
7	0	-	-	-	-	-
8	0	-	-	-	-	-
9	0	-	-	-	-	-
10	0	-	-	-	-	-

Análisis *postmortem* de cerebros de pacientes en diferentes etapas de la enfermedad de Parkinson y sus respectivos controles. Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de agregados de α -sinucleína. ENS: sistema nervioso entérico, dmX: núcleo motor dorsal del nervio vago, SN: sustancia *nigra*, mes: mesocorteza temporal, neo: neocorteza. Modificada de Braak et al., 2006.

Ambos estudios son de relevancia para el presente trabajo, pues aportan evidencia experimental que sustenta la hipótesis de la participación del SNP en etapas tempranas de la neurodegeneración. Experimentos con modelos animales, también han señalado la participación del SNP en la neurodegeneración (Pan-Montojo et al, 2010). Sin embargo, el modelo asume que el proceso degenerativo ocurre en presencia de agregados proteicos, sin tomar en cuenta que dicho proceso pudiese ocurrir desde la vida embrión-fetal y/o a lo largo de la maduración postnatal del individuo, hasta hacerse sintomática al alcanzar

edades avanzadas. En este sentido, es importante señalar, que estudios con modelos animales en los cuales se ha estudiado la participación del SNP sigue el mismo esquema conceptual (Pan-Montojo et al, 2010).

3.5. La teoría neurotrófica y los procesos neurodegenerativos

Una interacción trófica se define como la interdependencia a largo plazo que ocurre entre una neurona y las células que inerva (Purves, 1988). A fin de comprender las implicaciones que dichas interacciones tróficas tienen sobre el desarrollo y mantenimiento de la estructura neuronal, se han explorado los cambios morfológicos ocasionados por una modificación en los patrones de inervación sensorial.

Deitch y Rubel (1984), suprimieron la inervación del núcleo laminar y así evaluar los cambios morfológicos subsecuentes. El núcleo laminar se encuentra en el tronco encefálico y recibe aferencias desde el núcleo magnocelular por medio del tracto coclear. En conjunto, esta vía se encarga de regular la información auditiva en aves. Para llevar a cabo los experimentos, se utilizaron pollos de 9-12 días posnatales, a los que les fue lesionado el tracto coclear dorsal. La lesión tuvo como objetivo eliminar las aferencias ventrales del núcleo laminar, dejando intacta la inervación de la parte dorsal. Posteriormente, los animales fueron sacrificados en distintos intervalos de tiempo y se cuantificó la longitud dendrítica de las neuronas que integran el núcleo laminar. En la figura 6, se muestra una imagen representativa de los cambios morfológicos de la parte ventral (denervada) y dorsal (intacta) del núcleo laminar. La longitud dendrítica de la parte ventral está reducida aproximadamente en un 85%, esta modificación es evidente desde la primera hora posterior a la lesión. Por el contrario, las células de la parte dorsal no muestran cambios significativos en los diferentes tiempos evaluados. Los resultados señalan la importancia de las interacciones tróficas en la expresión de los patrones de inervación.

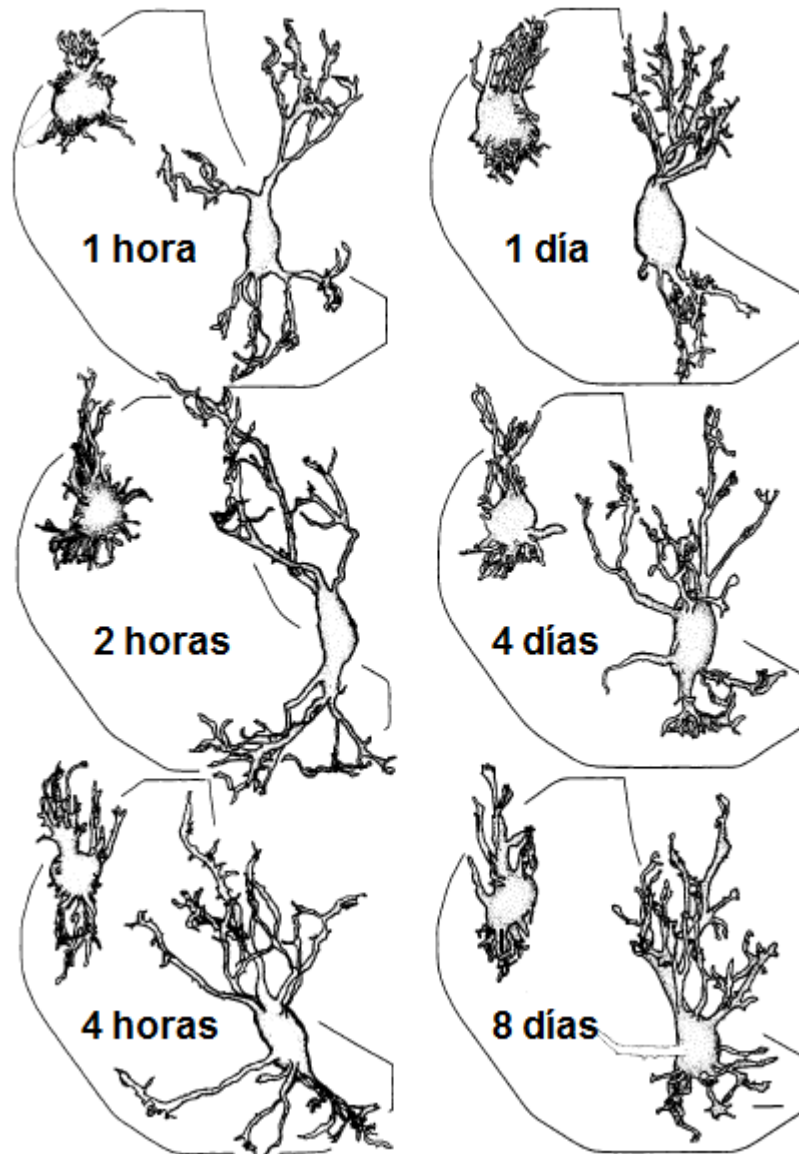


Figura 6. Imagen representativa de la pérdida de simetría en la parte ventral (izquierda) y dorsal (derecha) del núcleo laminar, evaluado a distintos tiempos. Las neuronas fueron impregnadas mediante la técnica de Golgi. Modificada de Deitch y Rubel, 1984.

Una situación semejante podría ocurrir en el sistema olfativo. Como se mencionó previamente, la anosmia es un síntoma temprano de la neurodegeneración que se atribuye a la pérdida de la integridad morfo-funcional del epitelio olfativo. Tras este daño, podría haber un proceso de neurodegeneración anterógrado que afectase, por desaferentación, a los relevos de la vía olfativa.

Por otra parte, sabemos que la memoria espacial es una de las funciones cognitivas afectadas durante la neurodegeneración. Aunque el hipocampo completo participa en el procesamiento de la memoria espacial, se ha propuesto que las neuronas piramidales del área CA3 modulan de manera primordial dicha función cognitiva.

Tomando en cuenta que la vía olfativa tiene como último relevo a las células piramidales del área CA3 del hipocampo, es factible pensar que el procesamiento de la información espacial pudiera verse afectado a consecuencia de la pérdida de inervación en el epitelio olfativo. Esta posibilidad no ha sido explorada en humano ni en otras unidades experimentales.

4. Justificación

Históricamente, las enfermedades neurodegenerativas han sido consideradas como procesos patológicos intrínsecos al SNC. Se presume que el estrés oxidativo, los depósitos de proteínas tóxicas asociados a la disfunción del sistema proteosomal y la neuroinflamación, son algunos factores que se suman para inducir la muerte neuronal. Sin embargo, las predicciones hechas con base en este modelo han sido ineficaces, pues no proveen de una explicación satisfactoria acerca de los procesos degenerativos que ocurren a nivel periférico y que anteceden a la degeneración central. De manera alternativa, se ha propuesto que la enfermedad neurodegenerativa es el resultado de la muerte de neuronas en el SNP y del transporte de proteínas tóxicas desde sus órganos blanco. No obstante, bajo este esquema conceptual el único marcador que se considera, indica el inicio de la enfermedad, es la presencia de agregados proteicos anormales, dejando de lado el proceso degenerativo que ocurre a lo largo de la ontogenia. Por ello, proponemos que la neurodegeneración, puede ser el resultado de la pérdida de inervación periférica que sobreviene como parte normal del envejecimiento. El presente trabajo se justifica en este último hecho.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar si la denervación del epitelio olfativo provoca alteraciones morfo-funcionales en el hipocampo de ratones.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar si la denervación del epitelio olfativo, inducida con sulfato de zinc ($ZnSO_4$), disminuye la arborización dendrítica de las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo.
2. Evaluar si la disminución en la arborización dendrítica del área CA3 del hipocampo, se relaciona con déficits en el desempeño de una tarea de memoria espacial.

6. Hipótesis

La denervación del epitelio olfativo disminuirá la arborización dendrítica de las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo. Dichos cambios morfológicos, causarán un déficit en el desempeño de una tarea de memoria espacial.

7. Materiales y métodos

7.1. Animales

Para el presente trabajo, se utilizaron 60 ratones macho de la cepa CD-1, con una edad de 60 días posnatales al inicio del experimento. Los ratones provinieron de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron mantenidos en cajas de policarbonato transparente (37x27x15cm) de manera comunal (5 ratones por caja), con un ciclo luz- oscuridad 12- 12 horas, respectivamente. Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum*. La manipulación experimental y los procedimientos de sacrificio fueron evaluados por la Comisión de Ética para el uso y manejo de Animales de Experimentación del IIB, UNAM.

7.2. Evaluación de la ejecución en el laberinto de agua de Morris

Todos los sujetos fueron entrenados en el laberinto de agua de Morris. El laberinto consistió en una tina circular con un diámetro de 120 cm, llena de agua a 21°C y situada a nivel del piso. Dentro de ella, se colocó una plataforma cuadrada de acrílico (10 x 10 cm) que se camuflaba con el color del agua para que los ratones no pudieran verla. El nivel del agua se encontraba al nivel de la plataforma, la cual estuvo situada en el cuadrante suroeste durante el entrenamiento. Alrededor del laberinto, se colocaron referencias visuales de color y formas geométricas distintivas para cada uno de los puntos cardinales: norte (N), sur (S), este (E), oeste (O), noreste (NE), noroeste (NO), sureste (SE) y suroeste (SO). En estas condiciones, la tarea de los animales consistió en aprender a ejecutar un nado referenciado que les permitiera alcanzar la plataforma de escape en el menor tiempo posible.

El entrenamiento se llevó a cabo durante 5 días consecutivos, con cuatro ensayos por sesión. Es decir, que todo el entrenamiento estuvo conformado por un total de 20 ensayos. El intervalo inter-ensayo fue de 15 minutos, con la finalidad de reducir el estrés de los animales. Durante las sesiones de entrenamiento únicamente se seleccionaron

cuatro posiciones de inicio (N, NO, E, SE), las cuales eran equidistantes a la posición de la plataforma. La secuencia de dichas posiciones fue aleatoria por sesión y por sujeto, cuidando que ninguna posición se repitiera más de una vez durante la misma sesión de entrenamiento. Los ratones eran liberados en el agua con la cabeza orientada hacia la pared de la tina. El ensayo terminaba una vez que encontraban la plataforma y subían a ella; se les permitió permanecer ahí durante 60 segundos, con la finalidad de que pudieran observar sus alrededores y así obtener información referencial. Si los ratones no lograban encontrar la plataforma en 60 segundos, eran guiados hacia la plataforma de escape. En cada ensayo se contabilizó el intervalo de tiempo transcurrido desde que el animal era liberado en el laberinto, hasta que subía a la plataforma.

La prueba de evocación se llevó a cabo al sexto día. Durante ella, las condiciones se mantuvieron iguales excepto que la plataforma se retiró del laberinto y se les permitió a los ratones nadar libremente durante 60 segundos. A diferencia de las sesiones de entrenamiento la posición de inicio fue el NE. Se evaluó el tiempo utilizado por cada ratón en cada uno de los cuadrantes del laberinto. Para la siguiente fase experimental, únicamente fueron seleccionados los sujetos que durante el día de prueba permanecieron al menos 17 segundos en el cuadrante meta (SO), quedando un total de 21 animales, los cuales fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los grupos: control, vehículo y ZnSO₄.

Una vez terminada la fase de entrenamiento y evocación, un subgrupo de ratones recibió el tratamiento con ZnSO₄, de acuerdo a lo que se describe en el siguiente apartado (7.3. Lesión de la mucosa olfatoria). Concluido el tratamiento, se realizó una nueva prueba de evocación bajo las condiciones ya descritas.

7.3. Lesión de la mucosa olfatoria

Con la finalidad de denervar el epitelio olfativo, se administró ZnSO₄ hepta-hidratado (Sigma-Aldrich) vía intranasal en una concentración de 5%, disuelto en agua desionizada como vehículo. El ZnSO₄ actúa sobre el epitelio olfativo causando muerte celular por necrosis (Harding, Getchell y Margolis, 1978). La administración se realizó durante 14 días consecutivos, en los cuales, cada sujeto del grupo experimental (n=8) recibió 20µl de

ZnSO₄ por fosa nasal cada 24 horas. El grupo tratado con el vehículo (n=7), únicamente recibió la administración de agua desionizada en el mismo volumen. Finalmente, el grupo control (n=6) no recibió ningún tipo de administración.

7.4. Análisis histológico

7.4.1. Evaluación de la morfología neuronal en el hipocampo

El sacrificio de todos los animales se llevó a cabo al día siguiente de la segunda prueba de evocación. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y, sus cerebros y fosas nasales rápidamente disecados. Los cerebros fueron impregnados con la técnica de Golgi rápido (FD Rapid GolgiStain™ Kit; FD NeuroTechnologies, Consulting & Services, Inc). Para ello, los cerebros frescos se colocaron en tubos protegidos de la luz durante 2 semanas, a temperatura ambiente, en 2ml de una solución de dicromato de potasio, cloruro de mercurio y cromato de potasio. A continuación, los cerebros se incubaron en una solución con nitrato de plata durante 2 semanas. Transcurrido este tiempo, los cerebros fueron cortados en un vibratomo (LEICA) a un grosor de 120µm, sumergidos en solución reveladora, lavados en PBS y posteriormente contrateñidos con violeta de cresilo al 0.5%.

En total fueron analizadas 105 neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo (5 neuronas por animal), las cuales fueron trazadas utilizando el Software Neurolucida® en una magnificación de 40x (Microscopio Nikon Labophot 2). Para cada neurona, el árbol dendrítico tridimensional, incluyendo todas las ramificaciones, fue reconstruido en un plano bidimensional y posteriormente cuantificado utilizando el análisis de círculos concéntricos de Sholl (Sholl, 1953). Dicho análisis se realizó con la ayuda del Software Neurolucida Explorer®. El primer círculo fue trazado rodeando el soma. Posteriormente, cada círculo de diámetro creciente, fue trazado a una distancia de 10µm de separación con respecto al anterior. Tres parámetros fueron evaluados mediante esta técnica: el área del soma, el número de intersecciones y la longitud dendrítica total, esta última evaluada para cada uno de los órdenes dendríticos encontrados dentro del análisis. Definimos como dendritas de primer orden a aquellas que se originan en el soma, las de segundo orden las que surgen de las de primer orden y así sucesivamente.

7.4.2. Evaluación de la morfología de la mucosa olfatoria

Las fosas nasales fueron postfijadas en paraformaldehído 4% (PFA) durante una semana. Posteriormente se colocaron en una solución descalcificadora (Decalcifier II, Leica) en un volumen de 35 ml durante 3 semanas. Pasado este periodo, las fosas nasales fueron colocadas nuevamente en PFA 4% y posteriormente deshidratadas en pasos de sacarosa al 15% y 30%, respectivamente. Una vez deshidratadas, las muestras fueron cortadas en un criostato (MICROM) a un grosor de 20µm; únicamente se recolectó uno de cada seis cortes por fosa nasal. Posteriormente se realizó una tinción hematoxilina/eosina para evaluar la integridad del epitelio olfativo. Para evaluar si la administración intranasal de ZnSO₄ en una concentración de 5% produjo modificaciones morfológicas en el epitelio olfativo, se analizaron en promedio, 8 cortes histológicos por animal de la parte medial de las fosas nasales (Fig. 1-B). En esta región nasal se localiza en mayor proporción el epitelio olfativo.

El análisis de los cortes histológicos se llevó a cabo en un microscopio compuesto Olympus CX21. Para las fotografías se empleó microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU). La reconstrucción del tejido completo se realizó una magnificación de 10x. El objetivo 60x fue utilizado para realizar acercamientos en donde la mucosa olfatoria pudiera observarse con detalle. La metodología completa se encuentra resumida en la figura 7.

7.5. Análisis estadístico

Para el laberinto de agua de Morris, en la fase de adquisición, el valor de la latencia de escape del total de ensayos por sesión fue promediado para obtener la media de desempeño de cada uno de los grupos. Debido a que la distribución de los datos no fue normal, se procedió a realizar un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para cada una de las sesiones.

En cada una de las pruebas de evocación, se analizó el tiempo de permanencia por cuadrante con un ANOVA de dos vías para muestras independientes, utilizando como factores el grupo ($ZnSO_4$, vehículo y control) y el cuadrante (NE, SE, NO, SO). Posteriormente se aplicó un análisis *post hoc* de Tukey para identificar entre que grupos se encontraban las diferencias que fueron estadísticamente significativas.

El área del soma se analizó mediante un ANOVA de una vía para muestras independientes. Para la longitud dendrítica total y el número de intersecciones se llevó a cabo un ANOVA de 2 vías. El primer factor para ambos casos fue el grupo. Se consideró el orden y la distancia desde el soma como segundo factor. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se procedió a realizar un análisis de comparación múltiple de Tukey. Para todos los casos, se consideró que las diferencias entre los grupos fueron significativas cuando el valor de $p \leq 0.01$. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con ayuda del programa Prisma 6.0.

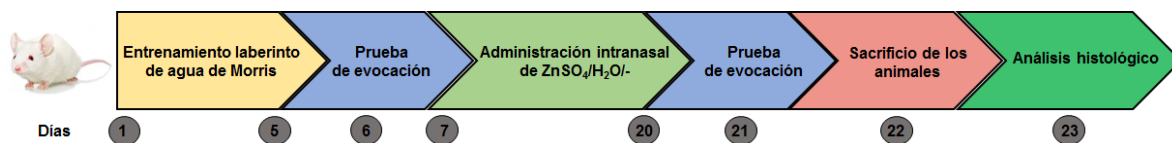


Figura 7. Esquema representativo de la metodología realizada. Se emplearon ratones de la cepa CD-1, con 60 días posnatales al inicio del experimento.

8. Resultados

8.1. Efecto de la administración intranasal de ZnSO₄

El análisis histológico de la mucosa olfativa teñida con hematoxilina-eosina, reveló que el grupo tratado durante 14 días con ZnSO₄, presenta una desorganización generalizada en la estructura del tejido epitelial. Un adelgazamiento de aproximadamente el 35% fue observado en el epitelio olfativo. Aunado a esto, se advirtió una disminución de las glándulas de Bowman en la lámina propia. Por el contrario, el grupo control y el grupo con administración del vehículo, no mostraron alteraciones en el grosor del epitelio ni en la conformación de las glándulas de Bowman (Fig. 8).

En total fueron analizados 84 cortes. El 100% de los cortes analizados, correspondientes al grupo tratado con ZnSO₄, se observó adelgazamiento del epitelio olfativo y disminución de las glándulas de Bowman, evidenciando el efecto de denervación que tuvo el tratamiento. En los cortes correspondientes al grupo control y vehículo, no se observó evidencia de daño epitelial.

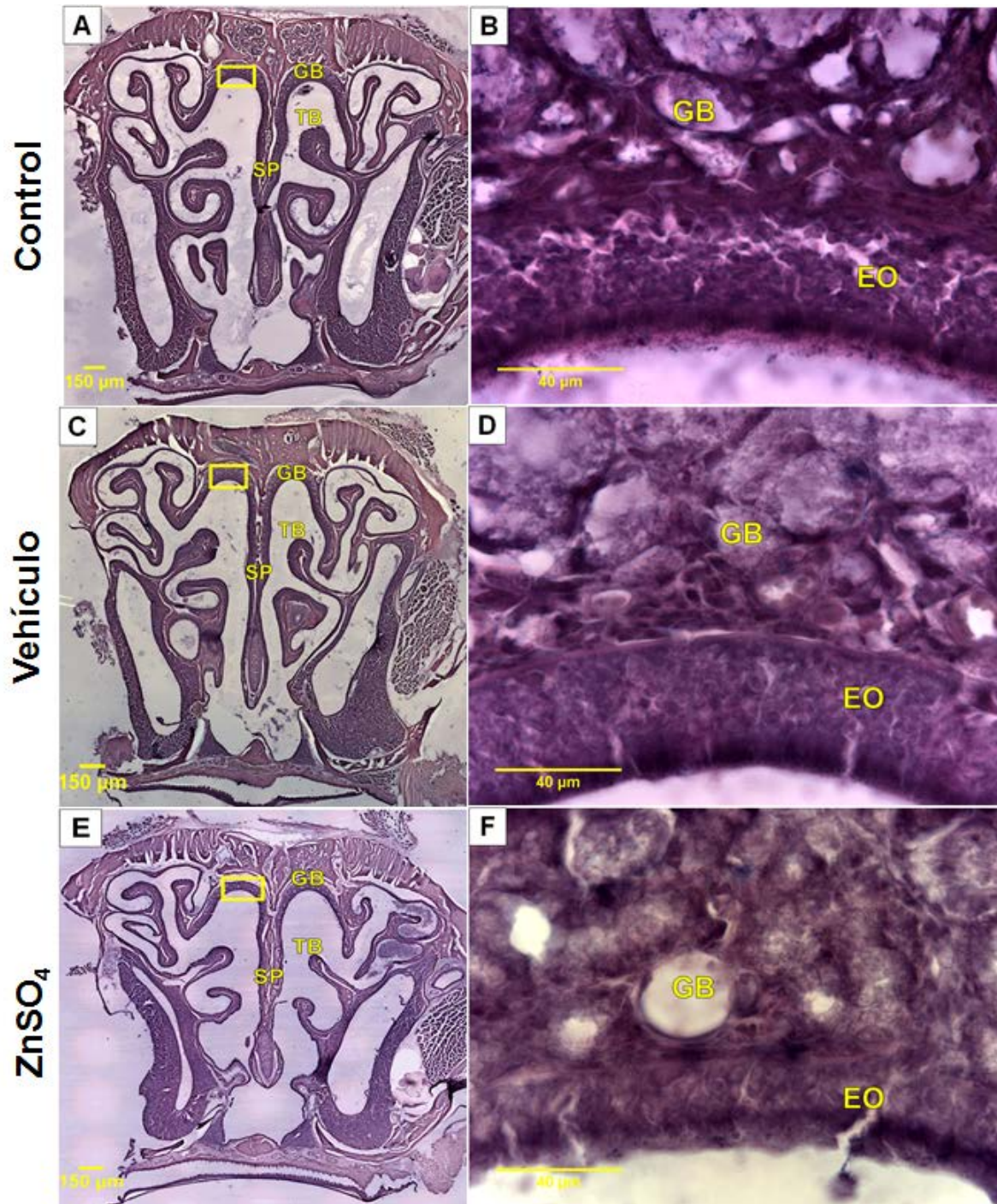


Figura 8. Análisis histológico del daño causado en el epitelio olfativo (EO) por el tratamiento con ZnSO₄. En la imagen se muestran cortes representativos de la cavidad nasal y el epitelio olfativo teñidos con hematoxilina-eosina. Grupo control (A-B), grupo con administración de vehículo (C-D) y grupo con administración de 14 días de ZnSO₄ (E-F). El grupo ZnSO₄ muestra un adelgazamiento del epitelio olfativo y una desorganización de las células que lo integran, comparado con los otros dos grupos. Glándulas de Bowman (GB), Septo nasal (SP), endoturbinales (TB).

8.2. Desempeño en memoria espacial

El laberinto de agua de Morris se empleó para evaluar la memoria espacial y así determinar si el daño observado en el epitelio olfativo de los sujetos tratados con $ZnSO_4$ tenía repercusiones sobre su desempeño en la tarea. De haber un déficit, éste podría adscribirse a alteraciones en el área CA3 del hipocampo, ya que previamente se ha reportado que las neuronas piramidales ahí localizadas, modulan de manera primordial dicha función cognitiva (McKinlay et al., 2010; Nakazawa et al., 2002). Al momento de realizar la fase de entrenamiento y la primera prueba de evocación, ninguno de los animales había recibido el tratamiento intranasal con $ZnSO_4$.

8.2.1. Entrenamiento

A lo largo de las 5 sesiones de entrenamiento se observó un decremento gradual del tiempo invertido por los animales para localizar la plataforma (latencia de escape). En la figura 9, se muestra el promedio de los cuatro ensayos por sesión para cada uno de los grupos en la fase de entrenamiento. Para corroborar que no existían diferencias previas a la prueba de evocación, se realizó una prueba Kruskal- Wallis comparando el desempeño por sesión entre los tres grupos. El análisis mostró la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p > 0.01$).

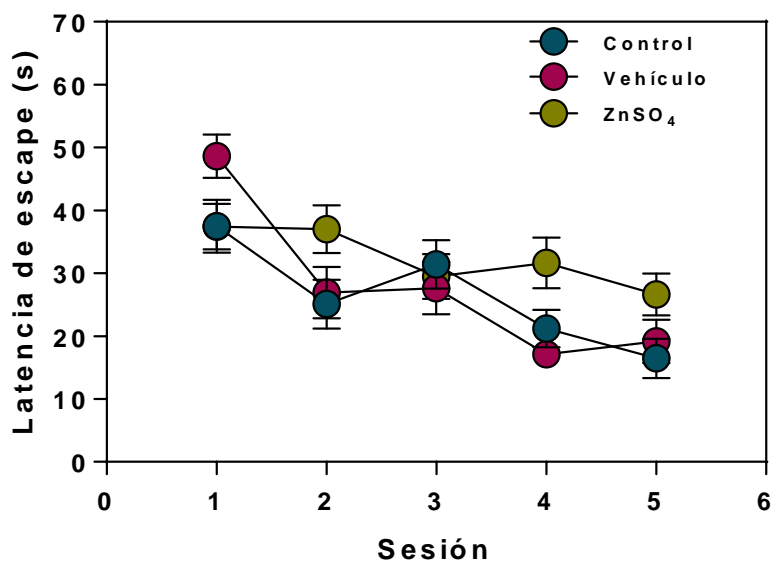


Figura 9. Entrenamiento en el laberinto de agua de Morris. En el eje de las abscisas se muestra cada una de las sesiones, en el eje de las ordenadas se encuentra la latencia de escape medida en segundos. Media \pm error estándar de la media (EEM).

8.2.2. Prueba de evocación

A fin de garantizar que los animales habían adquirido un nado referenciado, se llevó a cabo una prueba de evocación 24 horas después de que terminara la fase de entrenamiento. Ésta consistió en un solo ensayo con duración de 60 segundos en el que la plataforma de escape estuvo ausente. Se cuantificó el tiempo que los animales exploraban cada uno de los cuadrantes con el propósito de evaluar la preferencia por cuadrante. Los animales cuyo aprendizaje espacial fue correcto, debían nadar durante más tiempo en el cuadrante meta donde previamente estaba situada la plataforma, es decir, el cuadrante SO. De un total de 60 animales entrenados, únicamente 21 cumplieron con el criterio y fueron asignados aleatoriamente a alguno de los grupos.

La figura 10 muestra el tiempo promedio de permanencia por cuadrante para cada uno de los grupos. En todos, se observa una preferencia por explorar durante más tiempo el cuadrante SO. Para corroborar si existían diferencias estadísticamente significativas con el tiempo de exploración en los otros cuadrantes, se llevó a cabo un ANOVA de 2 vías,

utilizando como factores el cuadrante y el grupo. El análisis *post hoc* de Tukey reveló que los tres grupos mostraron diferencias significativas con respecto a los cuadrantes NE y SE, no así para el cuadrante NO, en el cual no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($F [6,72]= 0.6283, p=0.7071$).

Con la finalidad de corroborar que no existieran diferencias de ejecución entre los grupos previas al tratamiento que pudieran afectar los resultados posteriores, también se realizó una comparación entre grupos del tiempo invertido en el cuadrante SO. Esta comparación se evaluó mediante una ANOVA de dos vías, la cual no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F [6,72]= 0.6283, p=0.7071$).

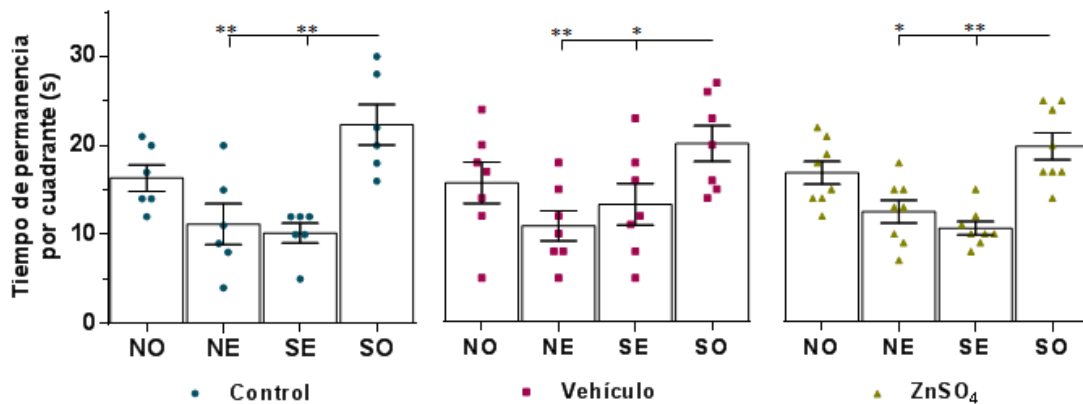


Figura 10. Tiempo de permanencia promedio por cuadrante para cada grupo de ratones durante la prueba de evocación. En cada barra se encuentra graficado el valor de la media \pm EEM y con símbolos, el desempeño individual de cada sujeto. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

8.2.3. Prueba de evocación después de la administración intranasal con ZnSO₄

Con el propósito de evaluar posibles déficits en la memoria espacial a consecuencia del tratamiento, se llevó a cabo una segunda prueba de evocación al día siguiente de que se diera por terminado el tratamiento intranasal con ZnSO₄. En la figura 11, se muestra el tiempo promedio de permanencia por cuadrante para cada uno de los grupos. Ninguno de los grupos mostró preferencia hacia el cuadrante SO. Es decir, la respuesta exploratoria de los tres grupos se distribuyó de manera homogénea en todos los cuadrantes. El

análisis estadístico confirmó que ninguno de los grupos mostró preferencia por algún cuadrante al no existir diferencias significativas entre grupos ($F [6,72]= 0.9547, p=0.4620$).

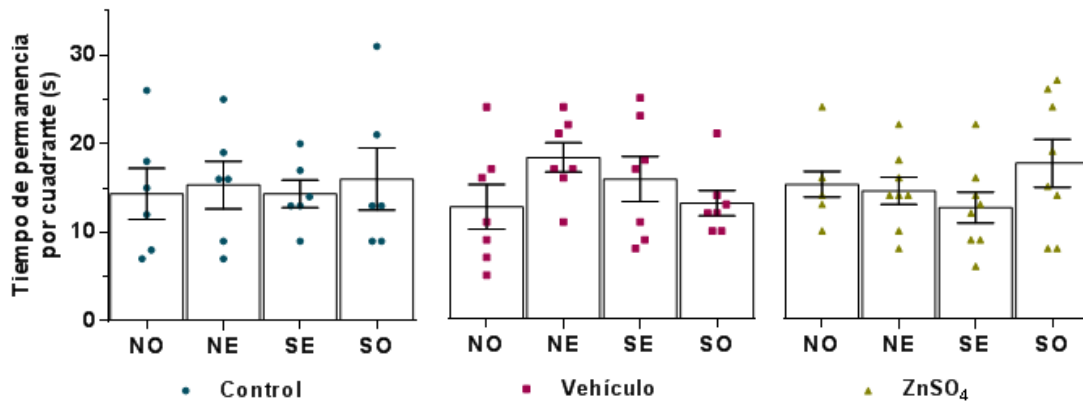


Figura 11. Preferencia por cuadrante para cada grupo de ratones, medida en segundos, después de la administración de ZnSO₄. En cada barra se encuentra graficado el desempeño individual de cada sujeto. Media ± EEM.

8.3. Análisis morfológico del área CA3 del hipocampo

Como previamente se mencionó en los resultados conductuales, el grupo con administración intranasal de ZnSO₄ no mostró diferencias en su ejecución con respecto a los otros grupos durante la segunda prueba de evocación. Este dato sugirió que el tratamiento no tuvo el efecto de denervación esperado sobre la vía hacia el hipocampo. No obstante ello, se llevó a cabo el análisis morfológico del área CA3 con la finalidad de corroborar esta posibilidad, o si por el contrario, las modificaciones morfológicas no habían sido suficientes para provocar déficits en el desempeño conductual.

8.3.1. Área del soma

En la figura 12, se muestra el área del soma (μ^2) para cada uno de los grupos. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía para muestras independientes, con la finalidad de comparar los efectos del tratamiento sobre el área del soma. No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos ($F [2,102]= 0.07342, p=0.9293$).

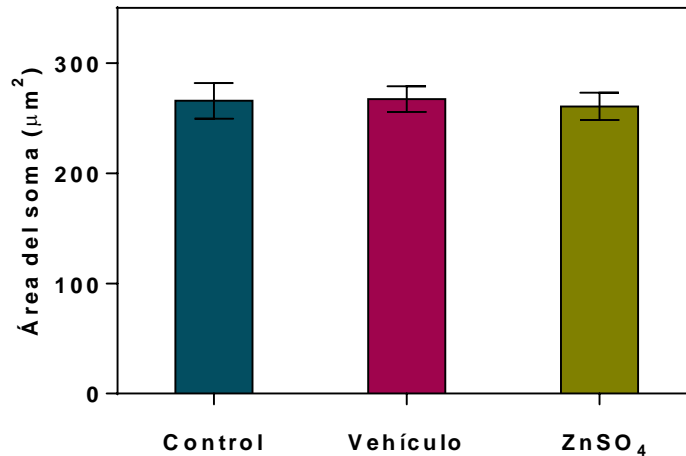


Figura 12. Área del soma de neuronas piramidales del hipocampo (CA3) en los tres grupos de ratones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas. Media \pm EEM.

8.3.2. Número de intersecciones

El número de intersecciones permite evaluar la complejidad de la arborización dendrítica con respecto a la distancia desde el soma. De manera general, podemos asumir que entre más arborizada sea una neurona, mayor es el número de conexiones que puede establecer hacia otras partes del cerebro. Para cada una de las neuronas trazadas, se contabilizó el número de intersecciones dentro de cada círculo concéntrico. Cada uno de ellos separados entre sí por una distancia de 10µm y trazados en un radio de 20 a 310 µm.

En la figura 13, se observa el número de intersecciones con respecto a la distancia desde el soma. El análisis de Sholl indica que en los tres grupos, el número máximo de intersecciones se localiza en sitios cercanos al soma, primordialmente en un rango de 60 a 80 µm. Para evaluar posibles diferencias en el número de intersecciones, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, tomando como factores el grupo y la distancia desde el soma. El análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos ($F [58, 1742]= 0.3625, p>0.9999$).

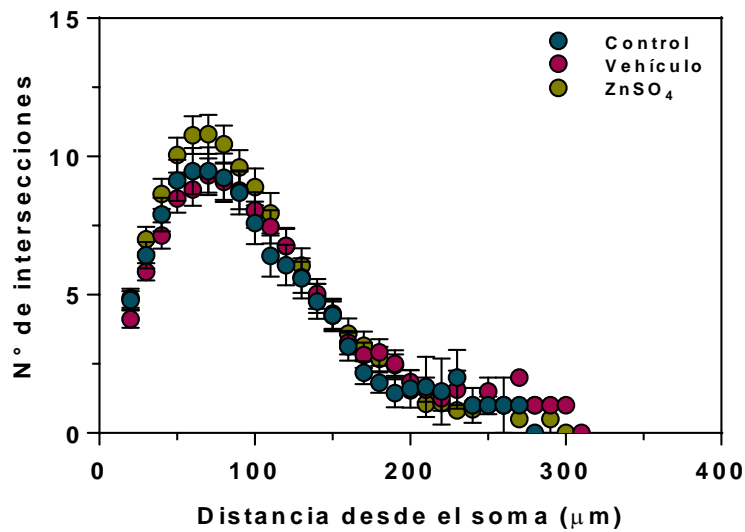


Figura 13. Número de intersecciones de acuerdo a la distancia desde el soma, evaluada para los tres grupos de animales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Media \pm EEM.

8.3.3. Longitud dendrítica total

Como un parámetro complementario para evaluar la complejidad de las neuronas piramidales del área CA3, se midió la longitud dendrítica total para cada uno de los órdenes. En total fueron analizadas 105 neuronas, las cuales tenían dendritas que iban del orden 1 al 14.

Con base en el análisis de Sholl pudimos observar, que los tres grupos tuvieron una longitud total promedio mayor en las dendritas del orden 1 al 5. En contraste, la longitud más corta se encontró en las dendritas del orden 9 al 14 (Fig. 14). Para corroborar si el tratamiento con ZnSO₄ había modificado la longitud total de las neuronas piramidales, se llevó a cabo un ANOVA de dos vías que tomó como factores el grupo y el orden. Dicho análisis, no reveló diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F [26,161]=0.6832, p=0.8729$).

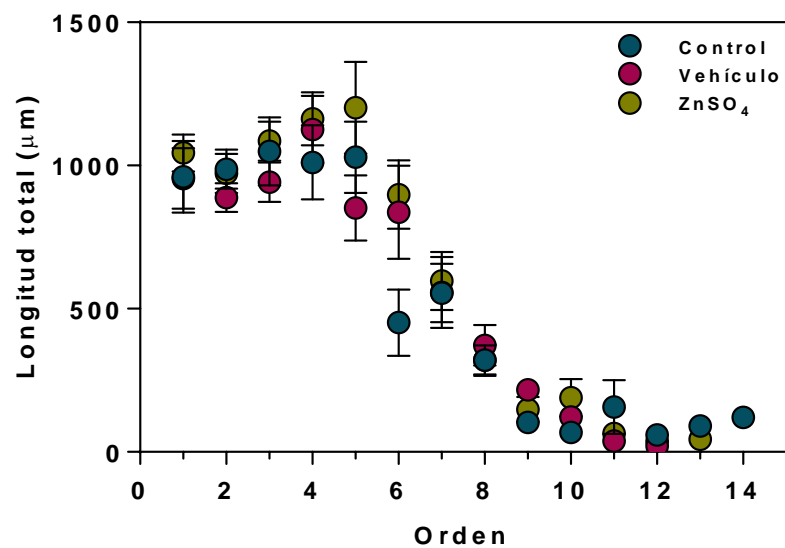


Figura 14. Longitud dendrítica total de neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo de ratones pertenecientes a los tres grupos estudiados, evaluada para cada uno de los órdenes dendríticos encontrados en el análisis de Sholl. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Media \pm EEM.

9. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo, evaluar si la pérdida de inervación en el epitelio olfativo podía provocar cambios morfológicos en las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo, así como la repercusión de estas modificaciones en el desempeño de la memoria espacial. Esto con la idea de apoyar la noción de que los procesos de denervación periférica podrían estar induciendo la pérdida neuronal central, un concepto que pudiese explicar la neurodegeneración central en las enfermedades neurodegenerativas.

Como primer paso, fue necesario corroborar la presencia del daño epitelial. Trabajos previos han reportado que la administración aguda de $ZnSO_4$ a una concentración del 5% es suficiente para causar la denervación del epitelio olfativo durante 3 semanas posteriores al tratamiento (Harding et al., 1978). No obstante, debido a la capacidad neurogénica que posee el epitelio olfativo, decidimos llevar a cabo la administración intranasal de $ZnSO_4$ (5%) durante 14 días consecutivos. De ésta forma podríamos provocar un proceso de denervación más duradero, que a largo plazo fuera capaz de modificar progresivamente los diferentes relevos de la vía olfatoria. Cuando comparamos la integridad del epitelio olfativo en los tres grupos, pudimos observar un adelgazamiento de la mucosa olfativa y una disminución en las glándulas de Bowman en el grupo de ratones tratado con $ZnSO_4$.

Una vez confirmado el efecto del tratamiento, nuestro siguiente paso fue evaluar el desempeño conductual. Previamente se ha reportado que la tasa de aprendizaje en ratones para el laberinto de agua de Morris es $>90\%$ (Vorhees y Williams, 2014), sin embargo, nuestros resultados mostraron que con 5 sesiones de entrenamiento de 4 ensayos cada una, únicamente el 30% de los animales entrenados aprendió la tarea. Si bien durante la prueba de evocación realizada antes del tratamiento, todos los grupos mostraron el patrón de respuesta esperado, teniendo un tiempo de permanencia mayor en el cuadrante objetivo. Cuando se llevó a cabo un segundo ensayo de prueba posterior al tratamiento, ninguno de los grupos mostró una latencia de exploración significativamente mayor en el cuadrante objetivo, con respecto a los otros cuadrantes. Dichos resultados no pueden ser considerados como un efecto del tratamiento, pues el patrón conductual de los grupos sin administración de $ZnSO_4$ no difirió con respecto al grupo tratado. El hecho de que nuestros sujetos sin administración farmacológica no hayan mostrado preferencia

por el cuadrante objetivo durante la segunda sesión de prueba, indica que la respuesta de aprendizaje se extinguió con el paso del tiempo. Sin embargo, previamente Patil, Sunyer, Höger y Lubec (2009) entrenaron a ratones CD-1 en el laberinto de agua de Morris y observaron que el aprendizaje sobre la tarea se mantiene incluso 12 días después de la fase de entrenamiento.

Con la finalidad de establecer si los resultados obtenidos en la tarea conductual eran consecuencia de condiciones de entrenamiento y manipulación inadecuadas, decidimos evaluar a un grupo de 5 ratas Wistar en el laberinto de agua de Morris (ver apartado 12.1). Todas las condiciones se mantuvieron iguales excepto que la plataforma de escape era de un área menor (7.5 x 7.5 cm). Nuestros resultados mostraron que 4 de 5 ratas (80%) ejecutaron correctamente durante la prueba de evocación, 14 días después se realizó una segunda prueba de evocación con la finalidad de evaluar si el aprendizaje se conservaba estable a pesar del paso del tiempo. A diferencia de los ratones, las ratas mantuvieron el patrón de exploración esperado sobre el cuadrante objetivo, como indicador de un correcto aprendizaje. Aunado a ello, las ratas mostraron menos variabilidad de respuesta a lo largo del entrenamiento. Con base en estos datos, podemos concluir que la baja tasa de aprendizaje observada en los ratones (30%), es más bien el resultado de características intrínsecas en los patrones de aprendizaje propios de la población evaluada en el presente estudio.

Pese a que la evaluación conductual no mostró diferencias entre ninguno de los grupos, se llevó a cabo el análisis morfológico del hipocampo. Nuestros resultados mostraron que la denervación del epitelio olfativo no tuvo ningún efecto sobre las neuronas piramidales del área CA3, puesto que el área del soma, la longitud dendrítica y el número de intersecciones, no difirió entre los sujetos tratados con ZnSO₄ y sus respectivos controles sin administración farmacológica.

Nuestros resultados negativos pueden explicarse con base en diferentes observaciones experimentales. Primero, si bien diversos estudios han confirmado la eficiencia del ZnSO₄ para inducir la denervación del epitelio olfativo (Harding et al., 1978; Andine, Axelsson y Jacobson, 1995; McBride, Slotnick y Margolis, 2003), la mayoría de ellos están enfocados a evaluar el efecto de ésta sobre conducta olfativa posterior al tratamiento (McBride et al., 2003; Slotnick, Glover y Bodyak, 2000). Por ello, pensamos que se requiere la estandarización de un protocolo de administración más prolongado que logre emular el

proceso degenerativo característico de las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Al respecto, consideramos que una dosis más prolongada nos permitiría inducir modificaciones morfológicas en los relevos distantes de la vía olfatoria, porque si bien son numerosos los estudios en los que se ha explorado la influencia de la inervación sensorial sobre el mantenimiento de la estructura morfológica en el cerebro, el efecto de la denervación únicamente ha sido observado en vías cortas con un solo relevo (Deitch y Rubel, 1984). Así, en futuras investigaciones, sería necesario evaluar los posibles cambios producidos en los diferentes relevos de la vía.

Por último, es de relevancia mencionar que el hipocampo es una estructura altamente inervada. Específicamente, el área CA3 se caracteriza por recibir aferencias recurrentes por parte de las otras áreas del hipocampo, así como desde la corteza entorrinal (Lee, Yoganarasimha, Rao y Knierim, 2004). Es probable que esta característica favorezca que el hipocampo sea menos susceptible a modificaciones morfológicas.

10. Conclusiones

1. El tratamiento intranasal con ZnSO_4 (5%), fue insuficiente para modificar el área del soma, el número de intersecciones y la longitud dendrítica total de las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo.
2. El paso del tiempo afecta negativamente la ejecución en el laberinto de agua de Morris, lo que hace imposible establecer una correlación entre la denervación del epitelio olfativo y sus repercusiones sobre el desempeño conductual.

11. Referencias

- Aarsland, D., Bronnick, K., Williams-Gray, C., et al. (2010). Mild cognitive impairment in Parkinson disease. A multicenter pooled analysis. *Neurology*, *75*, 1062-1069.
- Andine, P., Axelsson, R. y Jacobson, I. (1995). The effect of anosmia on MK-801-induced behaviour in mice. *Neuroscience Letters*, *190*, 113-116.
- Bendor, J., Logan, T. y Edwards, R. (2013). The Function of α -Synuclein. *Neuron*, *79* (6), 1-43.
- Bohnen, N.I. y Muller, M.L.T.M. (2013). *In vivo* neurochemical imaging of olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, *120* (4), 571-576.
- Bossomaier, T.R.J. (2012). The chemical senses. En *Introduction to the senses: from biology to computer science* (pp. 218-245). Nueva York, USA: Cambridge University Press.
- Braak, H. y Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, *82*, 239-259.
- Braak, H., Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R., Steur, E. y Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*, 197-211.
- Braak, H., Vos, R., Bohl, J. y Tredici, K. (2006). Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*, *396*, 67-72.
- Brown, R., Lockwood, A. y Sonawane, B. (2005). Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environmental Health Perspectives*, *113* (9), 1250-1256.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Giuffrida Stella, A.M., et al. (2001). Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochemical Research*, *26* (6), 739-764.

- Carson, M.J., Thrash, J.C. y Walter B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: the role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clinical Neuroscience Research*, 6 (5), 237-245.
- Chaudhuri, K.R., Odin, P., Antonini, A. y Martinez, P. (2011). Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism and Related Disorders*, 17, 717-723.
- Chen, W.W., Zhang, X. y Huang, W.J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13, 3391-3396.
- Ciechanover, A. y Brundin, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*, 40, 427-446.
- Dantuma, N. y Bott, L. (2014). The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7 (70), 1-18.
- Deitch, J. y Rubel, E. (1984). Afferent influences on brain stem auditory nuclei of the chicken: time course and specificity of dendritic atrophy following deafferentation. *The Journal of Comparative Neurology*, 229, 66-79.
- Deng, W., Aimone, J. y Gage, F. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11, 339-350.
- Doty, R.L. (2007). Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 13, 225-228.
- Doty, R.L. (2012). Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiology of Disease*, 46, 527-552.
- Doty, R.L., Reyes, P.F. y Gregor, T. (1987). Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 18, 597-600.
- Fuentes, A., Fresno, M., Santander, H., Valenzuela, S., Gutiérrez, M. y Miralles, R. (2011). Sensopercepción olfatoria: una revisión. *Revista Médica de Chile*, 139, 362-367.

- Furukawa, K., Matsuzaki- Kobayashi, M., Hasegawa, et al. (2006). Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *Journal of Neurochemistry*, 97, 1071-1077.
- Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, 26, 19-54.
- Harding, J., Getchell, T. y Margolis, F. (1978). Denervation of the primary olfactory pathway in mice. V. Long-term effect of intranasal ZnSO₄ irrigation on behavior, biochemistry and morphology. *Brain Research*, 140, 271-285.
- Kalová, E., Vlcek, K., Jarolímová, E. y Bures, J. (2005). Allothetic orientation and sequential ordering of places is impaired in early stages of Alzheimer's disease: corresponding results in real space tests and computer tests. *Behavioural Brain Research*, 159, 175-186.
- Kosaka, T., y Kosaka, K. (2009). Olfactory bulb anatomy (pp. 59-69). Elsevier.
- Kovács, T. (2004). Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. *Ageing Research Reviews*, 3, 215-232.
- Kovács, T., Cairns, N.J. y Lantos, P.L. (2001). Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages. *NeuroReport*, 12 (2), 285-288.
- Laczó, J., Vlcek, K., Vyhnalek, M., et al. (2009). Spatial navigation testing discriminates two types of amnesic mild cognitive impairment. *Behavioural Brain Research*, 202, 252-259.
- Lean, M.T. y Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-795.
- Lee, I., Yoganarasimha, D., Rao, G. y Knierim, J.J. (2004). Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. *Nature*, 430, 456-459.
- Lotsch, J., Reichmann, H. y Hummel, T. (2008). Different Odor Tests Contribute Differently to the Evaluation of Olfactory Loss. *Chemical Senses*, 33, 17-21.

- Madl, T., Chen, K., Montaldi, D. y Trapp, R. (2015). Computational cognitive models of spatial memory in navigation space: a review. *Neural Networks*, 65, 18-43.
- Mammucari, C. y Rizzuto, R. (2010). Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131, 536–543.
- McBride, K., Slotnick, B. y Margolis, F.L. (2003). Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the mouse? An olfactometric and anatomical study. *Chemical Senses*, 28, 659-670.
- McKinlay, A., Grace, R.C., Dalrymple- Alford, J.C. y Roger, D. (2010). Characteristics of executive function impairment in Parkinson's disease patients without dementia. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 16, 268-277.
- Moser, E., Kropff, E. y Moser, M.B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 69-89.
- Muslimovic, D., Post, B., Speelman, J.D. y Schmand, B. (2005). Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. *Neurology*, 65 (8), 1239-1245.
- Nakazawa, K., Quirk, M.C., Chitwood, R.A., et al. (2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*, 297 (5579), 211-218.
- Neves, G., Cooke, S. y Bliss, T. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 65-75.
- Olivares, J., Juárez, E. y García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*, 20-28.
- Palma, J.A. y Kaufmann, H. (2014). Autonomic disorders predicting Parkinson disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20 (1), 94-98.
- Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., et al. (2010). Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *Plos One*, 5 (1), 1-10.
- Patil, S.S., Sunyer, B., Höger, H. y Lubec, G. (2009). Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behavioural Brain Research*, 198, 58-68.

- Peters, R. (2006). Ageing and the brain. *Postgraduate Medical Journal*, 82, 84-88.
- Philo, J. y Arakawa, T. (2009). Mechanisms of protein aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 348-351.
- Purves, D. (1988). *Body and brain: a trophic theory of neural connections*. USA: Harvard University Press.
- Redmann, M., Darley-USmar, V. y Zhang, J. (2016). The role of autophagy, mitophagy and lysosomal functions in modulating bioenergetics and survival in the context of redox and proteotoxic damage: implications for neurodegenerative diseases. *Aging and Disease*, 7 (2), 150-162.
- Ross, C.A. y Pickart, C.M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends in Cell Biology*, 14 (12), 703-711.
- Ross, C.A. y Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10, 10-17.
- Shibley, M.T., Ennis, M., y Puche, A.C. (2004). Olfactory System. En *The rat nervous system* (pp. 923-964). USA: Elsevier.
- Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual cortex and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy*, 87, 387-406.
- Slotnick, B., Glover, P. y Bodyak, N. (2000). Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the rat? *Behavioral Neuroscience*, 114 (4), 814-829.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. y Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7, 65-74.
- Vorhees, C.V. y Williams, M.T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *Institute for Laboratory Animal Research*, 55 (2), 310-32.
- Witte, M.A., Geurts, J.J.G., de Vries, H.E., et al. (2010). Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion* 10, 411-418.

- Wood, R. y Chan, D. (2015). The hippocampus, spatial memory and Alzheimer's disease. *ACNR*, 15 (2), 5-7.
- Yu, S., Sun, L., Liu, Z., Huang, X., Zuo, L., Cao, C., Zhang, W., y Wang, X. (2013). Sleep disorders in Parkinson's disease: clinical features, iron metabolism and related mechanism. *Plos One*, 8 (12), 1-7.
- Zhang, J. y Darley-USmar, V. (2012). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease: Protein aggregation, autophagy, and oxidative stress. En A.K. Reeve et al. (Eds.), *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders* (pp. 95-111). Londres, Inglaterra: Springer.

12. Apéndices

12.1. Apéndice 1: Laberinto de agua de Morris en ratas

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la tasa de aprendizaje en ratones para el laberinto de agua de Morris es de aproximadamente el 90%. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que bajo las condiciones experimentales empleadas en el presente estudio, únicamente el 35% de los animales entrenados cumplió con el criterio para establecer que el aprendizaje había sido exitoso. Con el objetivo de determinar si nuestros resultados fueron consecuencia de condiciones inadecuadas en el protocolo o si por el contrario fueron derivados de características intrínsecas de los animales, llevamos a cabo el laberinto de agua de Morris utilizando como unidad experimental 6 ratas macho de la cepa Wistar con una edad aproximada de 3 meses.

Las condiciones experimentales fueron las mismas que describimos para los ratones (ver apartado 7.2), excepto que el tamaño de la plataforma fue menor (7.6 x 7.6 cm). Esta modificación se hizo con la finalidad de que la tarea no resultara más sencilla para las ratas y que por consiguiente, la latencia de escape fuera menor debido a la diferencia de tamaño entre especies. La prueba de evocación se realizó 24 horas después de que se diera por terminada la fase de entrenamiento. Una segunda prueba de evocación fue realizada 14 días después. Durante ese periodo, los animales no recibieron ningún tipo de manipulación experimental.

En la figura 15 se encuentra graficada la curva de aprendizaje. Para obtener la gráfica, se promediaron las latencias de escape de todos los sujetos para cada una de las sesiones. Se observó un decremento gradual en la latencia de escape, así como un comportamiento asintótico en las últimas tres sesiones de entrenamiento.

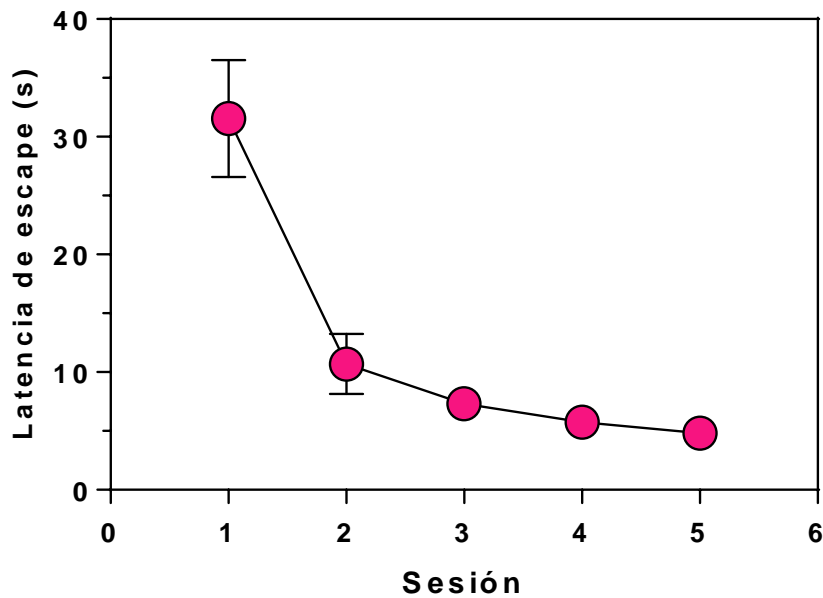


Figura 15. Entrenamiento en el laberinto de agua de Morris. Media \pm EEM. Se encuentran graficados únicamente, los cinco sujetos que cumplieron con el criterio de aprendizaje durante la primera prueba de evocación (n=5).

Durante la primera prueba de evocación, 5 de 6 ratas mostraron mayor tiempo de permanencia en el cuadrante meta (SO), es decir, donde se localizaba la plataforma durante el entrenamiento. En la figura 16 se observa el tiempo de permanencia promedio por cuadrante, para la primera y segunda prueba de evocación. Evidenciando en ambos casos, la preferencia hacia el cuadrante SO.

Con el objetivo de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo de permanencia en el cuadrante SO con respecto a los otros cuadrantes en ambas pruebas de evocación, se realizó un ANOVA de 2 vías. El análisis *post hoc* de Tukey reveló diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo de permanencia en el cuadrante SO con respecto al cuadrante NE, SE y NO para la primera prueba de evocación (Fig. 16-A). Para la segunda prueba de evocación únicamente se observaron diferencias significativas en el tiempo de permanencia del cuadrante SO con respecto al cuadrante NE y SE (Fig. 16-B) ($F [3,32]=1.003, p \leq 0.01$)

Con la finalidad de evaluar si existían diferencias significativas entre el tiempo de permanencia en el cuadrante SO durante la primera y la segunda prueba de evocación se

realizó un ANOVA de 2 vías. El análisis *post hoc* de Bonferroni no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F [3,32]=1.003, p>0.01$), corroborando que el aprendizaje en la tarea se mantuvo con el paso del tiempo.

Con base en los resultados obtenidos, demostramos que utilizando las mismas condiciones de entrenamiento, las ratas son más eficientes en aprender y retener la información espacial que los ratones y por consiguiente, podemos concluir que la baja tasa de aprendizaje observada en ratones (35%), es consecuencia de características intrínsecas a los sujetos utilizados en el presente estudio y no se encuentran relacionadas al protocolo de entrenamiento utilizado.

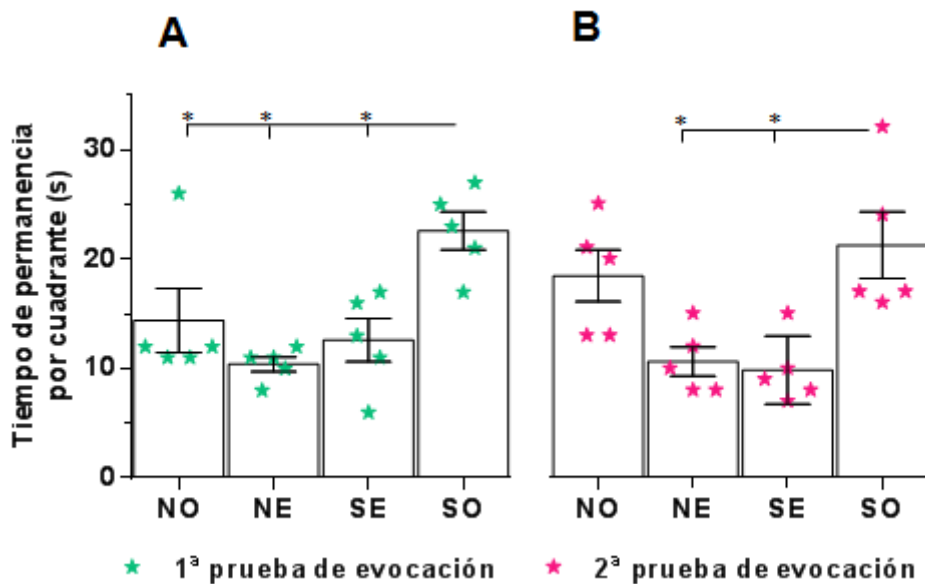


Figura 16. Tiempo de permanencia promedio por cuadrante durante la primera y segunda prueba de evocación. En cada barra se encuentra graficado el valor de la media \pm EEM, así como el desempeño individual de cada sujeto ($n=5$). * $p \leq 0.01$.