



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
SUPERIORES UNIDAD LEÓN**

**TEMA:**

**“MORFOLOGÍA Y DENSIDAD DE  
ASTROCITOS EN CA1 DEL HIPOCAMPO EN UN  
MODELO DE RATÓN CON ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER ESPORÁDICO”**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN FISIOTERAPIA**

**P R E S E N T A :**

**GEMA REYES OLVERA**

**TUTOR:**

**MTRA. CRISTINA CARRILLO PRADO**

**ASESOR:**

**DRA. PAOLA CRISTINA BELLO MEDINA**

**DR. DIEGO ALEXANDER GONZÁLEZ FRANCO**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIAS

Al hombre de mi vida, **mi padre**, por enseñarme que la única manera de alcanzar mis objetivos es tomando decisiones y llevándolas hasta el final; porque no importa si caigo, siempre estás ahí motivándome a intentarlo de nuevo; por confiar y creer en mí y enseñarme a hacerlo también; por apoyarme en todas mis locuras y darme la fuerza que necesité en mis momentos de cobardía; porque cuando más perdida me he sentido, tus palabras me guían y me reconfortan; por ser el centro de mi vida dándome coraje, fuerza y confianza para continuar. A ti papá, por tanto amor, por ser el principal promotor de mis sueños y darme el mejor ejemplo.

A **mi bella madre**, porque tu inmenso amor, ternura, comprensión y cariño me han dado luz en mis momentos de oscuridad, me han guiado en mis momentos de incertidumbre y han sido los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo y de mis ganas de crecer. Eres mi ejemplo a seguir, la mujer que me llena de orgullo y me inspira a ser mejor persona, la que nunca me ha abandonado ni dejado de creer en mí, la que ha puesto todo su empeño y esfuerzo en verme crecer, me ha impulsado y motivado a alcanzar mis sueños. A ti mamá, por tu amor incondicional, sin él, ni lo hubiera logrado.

A **Ángel**, el mejor hermano, por ser mi mayor confidente y darme los mejores consejos; por nunca dudar en mí y apoyarme incondicionalmente; por ser el refugio en el que siempre estaré segura; por ser la luz de mi vida.

A **Osiris**, por siempre estar dispuesto a dejarme analizar su marcha; por despertarme y quedarse conmigo en las madrugadas a estudiar hasta no poder más; por ser el mejor roomie, hermano, compañero de vida y sobre todo, la felicidad de mi alma.

Sin ustedes, no sería la persona que soy ahora, infinitas gracias por siempre estar, por ser mi guía, mi gran amor, mi complemento, mi todo. Los amo

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por acompañarme y brindarme la formación profesional, deportiva y cultural durante mi trayectoria a nivel medio superior y superior, en especial a la **Escuela Nacional de Estudios Superiores, unidad León**, por darme la oportunidad de estudiar la Licenciatura en Fisioterapia, con la mejor práctica clínica dentro y fuera del país.

Al **Instituto de Neurobiología** por aceptarme en este proyecto y brindarme todas las facilidades para llevarlo a cabo.

A la **Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda** por abrirme las puertas y hacerme parte de su laboratorio, por todos los comentarios constructivos que engrandecieron mi trabajo.

A la **Dra. Paola Cristina Bello Medina**, por toda la paciencia, asesoría y acompañamiento durante todo el proyecto, desde el planteamiento, hasta la conclusión del mismo. Gracias por todas las horas de enseñanza académica, de resolución de dudas, de supervisión y apoyo tanto en las técnicas, como en la presentación en los seminarios académicos.

A la **Mtra. Cristina Carrillo Prado**, mi tutora, por acompañarme no solo en este proyecto, sino también a lo largo de mi vida universitaria, en el servicio social y en el diplomado. Gracias por todos los conocimientos compartidos, por las palabras de aliento para seguir creciendo y por todo el apoyo para completar este proyecto.

Al **Dr. Diego Alexander González Franco**, por su asesoría a lo largo de este proyecto, por compartirme su conocimiento y mostrarme su pasión por las neurociencias.

A todos los investigadores del **Departamento de Neurobiología del desarrollo y Neurofisiología** que conocí, por todo su apoyo y enseñanza durante mi estancia en el laboratorio, así como, todos los comentarios que hicieron grandes aportaciones a mi trabajo.

A la **Dra. Thalía Harmony Baillet** de la **Unidad de Investigación en Neurodesarrollo**, por abrirme las puertas para la realización de mi servicio social y el diplomado.

Al **Ing. Sergio de Anda**, por todo su apoyo en los trámites administrativos, en el seguimiento de solicitud de beca, por sus conocimientos y por su amabilidad incondicional.

A la técnico académico **Azucena Aguilar Vázquez**, por su excelente apoyo técnico.

A las entidades de financiamiento:

Al **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT)**, por brindarme la beca como "Ayudante de investigador", expediente ayudante 11054779.

Al **Programa de Apoyo a Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**, por aprobar y contribuir al proyecto IN204519.

A las unidades de apoyo a la investigación del Instituto de Neurobiología:

Al Dr. Martín García Servín, la **Dra. Alejandra Castilla León** y la **Dra. María Carbajo** del **Laboratorio Universitario del Bioterio**, por la atención y la orientación en el manejo de los animales, así como facilitármelos para el proyecto.

A la **Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos** de la **Unidad de Microscopía**, por su apoyo y asesoría en la utilización del microscopio semiconfocal, así como la confianza en el préstamo del mismo.

A los doctores y maestros que me inspiraron a lo largo de mi estancia universitaria, que me enseñaron lo maravilloso que es esta carrera y que sembraron en mí, la pasión y el hambre por la fisioterapia, infinitas gracias **Dr. Barrera, Dra. Aline, Mtra. Paulina, Mtra. Adriana, Dra. Peralta, Dr. Valencia, Mtra. Ileana y Lic. Natalia**, por ser mi ejemplo a seguir.

A mis padres, **Alfonso y Emma** y mis hermanos, **Ángel y Osiris**, por ser mi motor y razón de vida; por darme los mejores consejos, regañarme en los momentos necesarios y guiarme a cada paso en mi camino; por enseñarme que con amor se llega más lejos.

A **Nay y Gis**, mis compañeras y cómplices en este viaje llamado titulación, gracias por todos los momentos de felicidad, frustración, enojo, desahogo, alegría, lágrimas, etc. etc., sin ustedes este proceso no habría sido lo mismo, gracias por tanto.

A **Vic**, infinitas gracias por acompañarme con paciencia y amor en todo el proceso; por estar para mí en los momentos más difíciles de la carrera; por creer en mí y motivarme a hacer lo mismo, incluso en mis momentos más pesimistas; por celebrar mis triunfos y ser mi apoyo en mis fracasos; por impulsarme a despegar mis alas; porque sé que siempre nos tendremos el uno al otro.

A **Karlita, Jenny y César**, mis fieles amigos, por tantos años de amistad, los mismos que de apoyo incondicional; por siempre creer en mí y motivarme a ser mejor cada día; porque a pesar de la distancia siempre se hacen sentir cerca; por hacerme sentir en familia y formar parte indispensable de mi vida.

A **Rubi, Juanjo, Jessi, Sofi, Alo, Gabi, Janet, Monse, Armandito, César, Mariana** y nuevamente, **Nay y Gis**, por hacer de mi vida universitaria, la mejor etapa de todas; porque todo siempre es más fácil en grupo; por tantas risas, experiencias, consejos, momentos y desvelos juntos; porque sé que la fisioterapia en sus manos, va por buen camino.

A **Edu**, por cambiarme la palabra sueños por metas e impulsarme a alcanzarlas; por motivarme a seguir analizando fotos cuando ya estaba harta; por ser mi traductor; por creer en mí; por llegar a mi vida y abrazarla con ternura, siendo la luz en el oscuro túnel llamado tesis; por reiniciarme la vida todos los días con su voz y su alegría.

A todos los pacientes que me permitieron aprender junto con ellos, por la confianza en mi trabajo y el tratamiento brindado.

## RESÚMEN

**INTRODUCCIÓN:** El modelo de la enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica inducida con estreptozotocina intracerebroventricular (STZ-icv), ha sido utilizado debido a su alta capacidad para reflejar las condiciones patológicas de la EA de tipo no familiar. En modelos animales de la EA, se ha observado astrodegeneración, alteración en la función fisiológica y de unión neurovascular de los astrocitos, así como alteraciones en la señalización y función sináptica dependiente de astrocitos. Además, en condiciones normales, se ha demostrado que el aumento de la sinapsis está relacionado con el aumento de la densidad de astrocitos y en conjunto con las neuronas son indispensables para favorecer las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria. Este aumento de la plasticidad sináptica, se ha observado después de la intervención con el sobreentrenamiento de una tarea cognitiva como el laberinto acuático de Morris (LAM) lo que produce cambios anatómo-funcionales que facilitan el aprendizaje y la memoria espacial. Por tanto, se planteó al sobreentrenamiento cognitivo en el LAM como una estrategia para la generación de cambios plásticos a través de un aumento de la densidad y una modificación en la morfología de los astrocitos localizados en los estratos *radiatum* y *oriens* de CA1 del hipocampo dorsal, que se atrofian en un modelo esporádico de la EA. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto de la administración de STZ-icv y del sobreentrenamiento cognitivo en el LAM, sobre el aprendizaje espacial, la densidad y la morfología de los astrocitos ubicados en los estratos *radiatum* y *oriens* de CA1 en el hipocampo dorsal. **METODOLOGÍA:** Se utilizaron 54 ratones macho de la cepa CD1, de 10 semanas de edad. Se les administró vehículo (VEH) o STZ icv (3 mg/kg) y fueron asignados en 4 grupos: 1) bioterio; 2) control nado; 3) LAM1, con una sesión o 4) tres sesiones de entrenamiento en el LAM (LAM3), posterior a ello, se les practicó eutanasia y se recolectó el hipocampo dorsal para la detección de la proteína GFAP mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se realizó el análisis conductual de los animales e histológico de los astrocitos en los estratos *radiatum* y *oriens* de CA1 del hipocampo. **RESULTADOS:** Los grupos STZ-icv presentaron alteraciones en el aprendizaje espacial, sin embargo, esta alteración en el aprendizaje se vio revertida en los grupos intervenidos con sobreentrenamiento cognitivo en el LAM. El análisis histológico demostró que los animales STZ-icv presentan una disminución significativa en la densidad de astrocitos en los estratos *radiatum* y *oriens* del hipocampo, efecto que se ve revertido mediante el sobreentrenamiento cognitivo. La morfología no presentó cambios significativos entre grupos. **CONCLUSIONES:** El modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica, inducido por STZ-icv, presenta alteraciones en el aprendizaje espacial, así como, alteraciones histológicas. El sobreentrenamiento cognitivo, puede resultar una herramienta útil en la intervención de la EA esporádica ya que logra revertir los efectos observados en este modelo preclínico.

**Palabras clave:** EAs, estreptozotocina, sobreentrenamiento, astrogliosis, *oriens*, *radiatum*.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Intracerebroventricular streptozotocin (icv-STZ) administration as a model of Alzheimer's disease (AD), has been used due to its high capacity to reflect the pathological conditions of non-familial AD. Astrodegeneration, alteration in the physiological function and neurovascular junction of astrocytes, alterations in astrocyte-dependent signaling, and synaptic function have been observed in animal models of AD. In addition, under normal conditions, it has been shown that the increase in the synapse is related to the increase in astrocytes density and these, in turn, together with neurons, are essential to promote cognitive functions such as learning and memory. This increase in synaptic plasticity has been observed after the intervention with cognitive overtraining of a spatial task, such as the Morris Water Maze (MWM), which produces anatomical-functional changes that facilitate learning and spatial memory. Therefore, cognitive overtraining in MWM was proposed as a strategy for the generation of plastic changes through an increase in density and a modification in the morphology of astrocytes in CA1 (*radiatum* and *oriens stratum*) of the dorsal hippocampus, which atrophies in a sporadic model of AD. **OBJECTIVE:** To assess the effect of icv-STZ administration and cognitive overtraining in MWM, on spatial learning, and density, and morphology of astrocytes located in CA1 *radiatum* and *oriens stratum* of the dorsal hippocampus. **METHODOLOGY:** 54 CD-1 male mice of 10 weeks old were used. They were administered vehicle (VEH) or STZ icv (3 mg/kg) and were assigned into 4 groups: 1) control without intervention; 2) swim control; 3) MWM1, with one session or 4) three training sessions in MWM (MWM3), after that, they were euthanized and the dorsal hippocampus was harvested for the GFAP protein using the immunohistochemistry technique. Behavioral and histological analysis of were carried out. **RESULTS:** icv-STZ groups presented spatial learning deficit, however, this alteration in learning was reversed in the intervened groups with cognitive overtraining in MWM. Histological analysis showed that icv-STZ animals had a significant decrease in astrocytes density in the *radiatum* and *oriens stratum* of the hippocampus, an effect that is reversed by cognitive overtraining. The morphology did not show significant changes between groups. **CONCLUSIONS:** The sporadic AD model, induced by icv-STZ, presents spatial learning and histological alterations. Cognitive overtraining can be a useful tool in the intervention of sporadic AD as it manages to reverse the effects observed in this preclinical model.

**KEY WORDS:** AD, streptozotocin, overtraining, astrogliosis, *oriens*, *radiatum*.

## ABREVIATURAS

EA - Enfermedad de Alzheimer  
A $\beta$  - Beta amiloide  
fAD - Enfermedad de Alzheimer familiar  
sAD - Enfermedad de Alzheimer esporádica  
APP - Proteína precursora de beta amiloide  
PSEN-1 - Presenilina 1  
PSEN-2 - Presenilina 2  
APOE - Apolipoproteína  
STZ - Estreptozotocina  
VEH - Vehículo  
ICV - Intracerebroventricular  
SNC - Sistema nervioso central  
GD - Giro dentado  
ALV - *Stratum alveus*  
OR - *Stratum oriens*  
P - *Stratum pyramidale*  
RAD - *Stratum radiatum*  
LACMOL - *Stratum lacunosum moleculare*  
MOL - *Stratum moleculare*  
SVZ - Zona subventricular  
BHE - Barrera hematoencefálica  
LCRa - Líquido cefalorraquídeo artificial  
GFAP - Proteína ácida fibrilar glial  
ROS - Especies reactivas de oxígeno  
LAM - Laberinto acuático de Morris  
PLP - Potenciación a largo plazo  
CCA - Corteza cingulada anterior  
GLU - Glutamato  
GABA - Ácido  $\gamma$ -amino butírico  
TNF- $\alpha$  - Factor de necrosis tumoral alfa  
Ach - Acetilcolina  
NA - Noradrenalina  
BIO - Bioterio  
CN - Control de nado  
LAM1 - Una sesión de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris  
LAM3 - Tres sesiones de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (sobrentrenamiento)  
PBS - Solución salina de fosfato  
PBS-T - Solución salina de fosfato-tween



# TABLA DE CONTENIDO

RESÚMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
ABREVIATURAS.....	6
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES.....	11
1. Enfermedad de Alzheimer.....	11
1.1 Prevalencia.....	11
1.2 Características clínicas.....	11
1.3 Etiología.....	12
2. Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer.....	14
2.1 Transgénicos.....	14
2.2 Inducidos.....	14
2.2.1 Cepa CD1.....	15
3. El modelo esporádico de estreptozotocina intraverebroventricular STZ-icv ..	16
3.1 Estreptozotocina.....	16
3.2 Antecedentes del modelo STZ-icv.....	16
4. Astrocitos hipocampales.....	19
4.1 Función.....	20
4.2 Astrogliosis reactiva.....	22
4.3 La proteína ácida fibrilar glial (GFAP).....	23
4.4 Astrocitos en la Enfermedad de Alzheimer.....	24
4.5 Astrocitos en el aprendizaje y la memoria.....	25
5. El hipocampo.....	27
5.1 Composición anatómica.....	28
5.2 Conectividad.....	29
5.3 Neuroquímica.....	31
5.4 Función.....	31
6. Sobreentrenamiento cognitivo.....	33
6.1 Laberinto acuático de Morris.....	34
6.2 Impacto del sobreentrenamiento cognitivo en modelos animales.....	34
JUSTIFICACIÓN.....	41

<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	42
<b>HIPÓTESIS</b> .....	42
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	42
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	43
<b>METODOLOGÍA</b> .....	43
<b>Sujetos, material y método</b> .....	43
<b>Cirugía estereotáxica</b> .....	44
<b>Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris</b> .....	45
<b>Eutanasia y obtención de muestras</b> .....	47
<b>Manejo de los tejidos y obtención de los cortes</b> .....	47
<b>Inmunohistoquímica de fluorescencia</b> .....	48
<b>Adquisición y análisis de imágenes</b> .....	48
<b>Análisis estadístico</b> .....	50
<b>RESULTADOS</b> .....	51
<b>Registro del peso corporal</b> .....	51
<b>Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre el aprendizaje espacial</b> .....	52
<b>Velocidad de Nado en el LAM</b> .....	53
<b>Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la morfología de astrocitos en el stratum radiatum del CA1 del hipocampo</b> .....	54
<b>Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la densidad de astrocitos en el stratum radiatum del CA1 del hipocampo</b> .....	55
<b>Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la morfología de astrocitos en el stratum oriens del CA1 del hipocampo</b> .....	58
<b>Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la densidad de astrocitos en el stratum oriens del CA1 del hipocampo</b> .....	58
<b>DISCUSIÓN</b> .....	61
<b>CONCLUSIONES</b> .....	65
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

## INTRODUCCIÓN

El aumento de la longevidad y la supervivencia ha provocado un incremento de la prevalencia de enfermedades crónicas y una compresión de morbilidades en edades avanzadas (Garre-Olmo, 2018), entre ellas, la demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia en los adultos mayores. Es una condición adquirida, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, que interfiere severamente en las actividades de la vida diaria humana. Se define como un conjunto de síndromes neuropsiquiátricos caracterizado por la presencia de deterioro tanto cognitivo (memoria, pensamiento, cálculo, orientación, comprensión, aprendizaje, lenguaje, juicio, etc.), como funcional (actividades de autocuidado), además, por lo regular se acompaña de deterioro del control emocional y del comportamiento social. El detrimento creciente de estas funciones lleva (en un periodo terminal) a la pérdida del cuidado personal y de la independencia, generando una enorme carga a los pacientes, sus familias, cuidadores y sistemas de asistencia sanitaria y social (Barkhof, Fox, Bastos-Leite, & Scheltens, 2011; Ma Elisa Alonso Vilatela Dra, Ana Luisa Sosa Ortiz Dra Zoila Trujillo De los Santos, 1996). En México, el 31% de los años perdidos por discapacidad, son las enfermedades mentales, y de ellas, las demencias son la causa número uno, con el 6.1% (Álvarez-cisneros et al., 2017).

Aunque la demencia es una entidad sindrómica, existen distintos subtipos de demencia que difieren en su etiología, forma de presentación, curso clínico y trastornos asociados (Garre-Olmo, 2018). La demencia más común a nivel mundial es la enfermedad de Alzheimer (EA), la cual es un trastorno neurológico de origen multifactorial, incurable, progresivo y mortal que afecta al cerebro humano, caracterizado por un claro declive cognitivo (memoria, orientación, juicio, lenguaje) y funcional. Debido a su alta tasa de discapacidad y mortalidad, se ha establecido a la EA como un problema de salud prioritario (Celis-De la Rosa et al., 2018).

Actualmente uno de los focos de atención en los esfuerzos por dilucidar la etiología de la enfermedad, se centra en torno a la neuroinflamación. Se ha descrito un importante papel de los astrocitos en el proceso de la neurodegeneración, ya que, el papel de los astrocitos en el procesamiento sináptico y de las redes, parece ser plástico y estar sujeto a perturbaciones. En condiciones patológicas (como en la EA), las interacciones astrocito-neurona pueden sufrir cambios dramáticos, con un fuerte impacto en los circuitos cerebrales que apoyan la formación de la memoria y la función cognitiva. Diversos estudios han mostrado mayor expresión de varios receptores en los astrocitos que rodean los depósitos de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), presentes en la EA, lo que probablemente afecta la señalización y

función sináptica, sin embargo, hace falta mayor investigación en torno a ellos (Santello, Toni, & Volterra, 2019).

Para esclarecer los mecanismos subyacentes a la EA, se han utilizado modelos animales tanto transgénicos como inducidos con el objetivo de estudiar aspectos que en los seres humanos sería imposible. Estos modelos mimetizan la enfermedad y con ello es posible estudiar el inicio y la progresión de la enfermedad, así como el desarrollo de métodos de intervención tanto farmacológicos como no farmacológicos (Mullane & Williams, 2019).

En la búsqueda de intervenciones que puedan dar solución al problema planteado, se han realizado numerosos estudios en los que se han demostrado efectos positivos para compensar el deterioro cognitivo con programas de entrenamiento cognitivo, ya sean generales o específicos para funciones como la memoria. Estos programas aplicados en adultos mayores, han mostrado efectos benéficos a corto y mediano plazo en la memoria, la atención, el razonamiento inductivo y la función ejecutiva (Valencia Marín et al., 2008) y, en modelos animales, han señalado efectos positivos en funciones cognitivas y en desórdenes de comportamiento (Bashiri, Enayati, Bashiri, & Salari, 2020).

Por otro lado, se ha señalado que la actividad física influye positivamente en el desempeño cognitivo tanto en humanos, manifestado en la memoria, planeación y coordinación motora (Wolf Dieter Oswald, Rupprecht, Gunzelmann, & Tritt, 1996; Valencia Marín et al., 2008), como en modelos animales, mostrado en la inhibición de la pérdida sináptica y neuronal (Wu et al., 2018), en la regulación del estrés neuroinflamatorio y oxidativo, en la polarización de la microglia, etc. y con ello, mejoras en las tareas cognitivas (Lu et al., 2017). Por lo tanto, existe evidencia en ambos (humanos y animales) de que tanto el entrenamiento cognitivo, como el entrenamiento físico resultan benéficos y, debido a ello, se han propuesto protocolos (en humanos), de entrenamiento combinado de memoria y psicomotricidad, mostrando mejoras cognitivas mayores en comparación con los entrenamientos por separado, manifestado inmediatamente y manteniéndose durante más de cinco años posterior a la intervención (Wolf D. Oswald, Gunzelmann, Rupprecht, & Hagen, 2006; Wolf Dieter Oswald et al., 1996; Valencia Marín et al., 2008). En el mismo sentido, en animales se ha descrito que las tareas que involucran habilidades motrices (ejercicio) y cognitivas (aprendizaje) en conjunto, resultan en un incremento de neurogénesis en el giro dentado, así mismo, se han relacionado con un aumento en el número, la densidad y ramificación de procesos de astrocitos (Jahanshahi, Sadeghi, Hosseini, Naghdi, & Marjani, 2008).

# ANTECEDENTES

## 1. Enfermedad de Alzheimer

La EA es la forma más común de demencia, representa entre el 60 y 80% de los casos, despoja al individuo de su independencia y es la quinta causa de muerte en adultos mayores, por lo cual, es reconocida por la Organización Mundial de la Salud como un problema de salud prioritario (Katzman, 2018). Fue descrita cualitativamente por primera vez por Alois Alzheimer en 1906 al describir el caso de Auguste Deter, una mujer de 51 años con trastornos cognitivos, desorientación, delirios y otros cambios de comportamiento. Años más tarde, a mediados de 1980, se identificaron las principales identidades neuropatológicas de la enfermedad, caracterizadas por la aparición de fibrillas de  $\beta$  amiloide, las cuales forman placas afuera de las neuronas y la hiperfosforilación de la proteína tau dentro de ellas (Soria Lopez, González, & Léger, 2019).

### 1.1 Prevalencia

Se estima que la prevalencia de la EA en el mundo, en personas de 65 años de edad, es del 5%, la cual, crece exponencialmente de los 65 a los 85 años, duplicándose cada 5 años y estabilizándose a partir de los 85 a 90 años, siendo el promedio de muerte 8,5 años desde la presentación (Ma Elisa Alonso Vilatela Dra Ana Luisa Sosa Ortiz Dra Zoila Trujillo De los Santos, 1996). Por su parte, en México, se estima que existe una prevalencia del 7.3% con una incidencia de 27.3/1000 personas al año de la población adulta mayor mexicana. Los factores de riesgo más significativos para el desarrollo de la EA en adultos mayores en México, son: la diabetes, el síndrome metabólico y obesidad, seguido de la edad, la pobre o nula actividad física y la depresión (Reyna Carrizales, González Rubio, López Esqueda, 2014). La identificación de un gran número de factores de riesgo asociados, da una fuerte indicación de la complejidad y de la heterogeneidad del inicio de la enfermedad (el inicio puede no siempre ser impulsado por mecanismos idénticos).

### 1.2 Características clínicas

La EA es una enfermedad progresiva, con el paso de los años y a medida que la patología avanza en nuestro cerebro, se agravan los síntomas (Mantzavinos & Alexiou, 2017). En sus primeras etapas se presenta una pérdida de memoria leve, el individuo empieza a tener dificultades para recordar información recién aprendida (manifestación de la afectación en el hipocampo, área encargada del aprendizaje), y conforme pasa el tiempo, mayores son los síntomas que aparecen, se hace visible la desorientación; la pérdida de confianza; las dificultades con la multitarea; los cambios en el humor y en el comportamiento; la confusión cada vez más grave en relación con eventos, horas y lugares; las sospechas infundadas

sobre familiares, amigos y cuidadores profesionales, y finalmente, las personas pierden la capacidad de mantener una conversación, responder al entorno, hablar, deglutir y caminar, llevándolos de la dependencia parcial a la total.

Los exámenes físico y neurológico suelen ser normales en las primeras etapas del proceso de la enfermedad. A medida que avanza la enfermedad, puede haber evidencia de signos extra-piramidales, posiblemente relacionados con alguna patología comórbida, por ello, además de las pruebas cognitivas, se debe examinar la marcha, evaluación del dolor, caídas, detrimento de la funcionalidad y problemas de seguridad, y en caso de ser necesario, impulsar la derivación a fisioterapia (Soria Lopez et al., 2019).

### **1.3 Etiología**

La EA se puede categorizar en dos tipos clínicos: EA familiar y EA esporádica (fAD y sAD respectivamente, por sus siglas en inglés). Ambos desarrollan fenotipos patológicos similares (placas seniles, ovillos neurofibrilares, alteraciones sinápticas, pérdida neuronal, etc.), sin embargo, los factores que desencadenan el proceso neurodegenerativo y la edad de inicio de los síntomas, son completamente diferentes (Baglietto-Vargas, Shi, Yaeger, Ager, & LaFerla, 2016).

En la fAD (1-2% de todos los casos de EA), el proceso patológico causado por la presencia de mutaciones autosómicas dominantes en uno de tres genes, conducen a un cambio en la producción o procesamiento de beta amiloide (A $\beta$ ) (Soria Lopez et al., 2019). Estos genes incluyen: I) Proteína precursora de  $\beta$  amiloide (APP), ubicada en el cromosoma 21, representando aproximadamente el 26% del total de casos de fAD; II) Presenilina-1 (PSEN-1), ubicada en el cromosoma 14, con el 67%; III) Presenilina-2 (PSEN-2), ubicada en el cromosoma 1, responsable del 7% (Baglietto-Vargas et al., 2016).

Los individuos afectados de este grupo suelen desarrollar síntomas a edades predecibles dictadas por la mutación genética específica, pudiendo tener un inicio tan temprano como en la tercera o cuarta década de la vida, siendo la media de aparición 46,2 años. Además de la sintomatología amnésica, se ha descrito la aparición temprana de cambios no amnésicos y no cognitivos, por ejemplo: paraparesia espástica, cambios de comportamiento y psiquiátricos, angiopatía amiloide cerebral severa y ataxia cerebelosa (Ryman et al., 2014).

Por su parte, sAD, la cual representa la mayoría de los casos (98%), es compleja y multifactorial, resultado de la combinación de alteraciones en múltiples vías (factores genéticos, epigenéticos, estilo de vida, etc.), actuando así, factores internos y externos en conjunto, en el desarrollo de la enfermedad. Además, la mayoría de los pacientes con sAD son adultos mayores (inicio medio de los síntomas, 68 años), que comúnmente sufren una

variedad de comorbilidades (diabetes, accidente cerebrovascular, estrés, convulsiones, osteoporosis, enfermedad renal, entre otras), las cuales pueden aumentar en gran medida la complejidad y juegan un importante papel en el curso de la enfermedad (Baglietto-Vargas et al., 2016).

A pesar de los grandes esfuerzos por parte de los investigadores por dilucidar la etiología de la enfermedad, actualmente se sigue sin poder llegar a un consenso de ella, sin embargo, se han descrito diversas teorías intentando acercarse a su comprensión.

Algunas de las teorías en torno a el sAD, se basan en: I) Una aceleración del envejecimiento (en el cerebro cognitivamente normal, hay una reducción del volumen y peso cerebral relacionada con la edad, agrandamiento de los ventrículos y pérdida de sinapsis y dendritas en áreas seleccionadas, así como, presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares); II) Degeneración de vías anatómicas, incluidas las vías colinérgicas y corticocorticales; III) Factores ambientales como exposición al aluminio, traumatismo craneoencefálico y desnutrición; IV) Factores genéticos que incluyen mutaciones de los genes de la APP y presenilina (PSEN), y variación alélica en la apolipoproteína E (APOE); V) Trastorno metabólico resultante de una disfunción mitocondrial; VI) Factores vasculares, tales como una barrera hematoencefálica comprometida; VII) Disfunción del sistema inmunológico y agentes infecciosos; VIII) Aumento del estrés oxidativo y; IX) Alteraciones en la neuroinflamación (Armstrong, 2013).

Durante los últimos 20 años, la investigación ha avanzado, orientándose hacia el diagnóstico preclínico o pre-sintomático de la enfermedad, ya que la EA ciertamente tiene un comienzo mucho más temprano, quizás con manifestaciones subclínicas, que ocurren décadas antes de que surjan los claros cambios cognitivo-conductuales característicos de la enfermedad (Engelhardt, 2012).

Actualmente, uno de los focos de atención dentro de la investigación está dado en torno a la teoría de los trastornos metabólicos (que parecen contribuir a la neuroinflamación y con ello a la neurodegeneración), entre los cuales se observan alteraciones del metabolismo de la glucosa y la utilización de energía en las primeras etapas de la enfermedad. Estudios sugieren que existe resistencia a la insulina cerebral y alteraciones en la señalización de la misma, tanto en EA como en casos de diabetes tipo 2 y, en consecuencia, se ha propuesto que la EA es una forma de diabetes mellitus específica del cerebro llamada “diabetes tipo 3” (Chen et al., 2012; Takeda et al., 2010).

## **2. Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer**

Para dilucidar aún más los mecanismos subyacentes a la EA y con el objetivo de responder a preguntas que antes eran imposibles de examinar en humanos, se han generado modelos animales (tanto transgénicos, como inducidos) que reflejan las condiciones patológicas de la enfermedad (Mullane & Williams, 2019).

### **2.1 Transgénicos**

Estos modelos animales consisten casi exclusivamente en ratones transgénicos que expresan genes humanos que dan como resultado la formación de placas amiloides (por expresión de APP humana sola o en combinación con PSEN1 humana) y ovillos neurofibrilares (por expresión de MAPT), sin embargo, la mayoría de los modelos transgénicos de EA tienen patología dependiente de la expresión de mutaciones de fAD y la mayoría de los ensayos clínicos de EA se llevan a cabo en pacientes con sAD, en quienes la patogénesis tiene diferencias significativas con la fAD, esto representa un obstáculo para la traducibilidad del éxito en estos modelos (Eleanor Drummond, 2017).

### **2.2 Inducidos**

Debido a lo anterior, se han desarrollado los modelos químicamente inducidos, en los cuales, se utilizan roedores (principalmente) a los que se les administra un fármaco que puede desencadenar la respuesta característica de sAD, uno de estos modelos es la inducción de la enfermedad mediante la administración intracerebroventricular de esptreptozotocina (STZ-icv).

El modelo animal STZ-icv ha demostrado varias ventajas frente a los modelos transgénicos: I) la manipulación genética no es un punto de partida indispensable desde el día de nacimiento del animal; II) las alteraciones patológicas en el cerebro pueden iniciar a cualquier edad; III) el inicio, desarrollo y progresión de los déficits cognitivos, cambios bioquímicos y estructurales, pueden seguirse desde el momento preciso del daño cerebral inducido; y, IV) este modelo brinda la oportunidad de evaluar el potencial de algunas intervenciones terapéuticas (fármacos, ejercicio, dieta, etc.), con respecto a la prevención de la enfermedad, cuando se inicia el tratamiento antes o en paralelo a la inducción STZ-icv, así como, la modificación y progresión, cuando se administra el tratamiento después de la manifestación del deterioro cognitivo (Salkovic-Petrisic, Knezovic, Hoyer, & Riederer, 2013).

Gracias a los estudios que proponen la inducción de la EA mediante la inyección de éste fármaco, se ha aceptado que sAD y su modelo obtenido por administración de STZ-icv, sean



reconocidos como un estado cerebral resistente a la insulina, análogo cerebral del síndrome de resistencia a la insulina de los tejidos periféricos (Grieb, 2016).

### 2.2.1 Cepa CD1

El ratón cepa CD1 (*Mus musculus domesticus*), es un modelo de roedor no consanguíneo, con muchos atributos para la investigación por su fácil manejo, apropiado para la crianza y manipulación y, que, además, representa de una manera óptima la variabilidad genética de una población humana típica. El mayor uso de este modelo animal en la investigación, debido a su cepa y a su susceptibilidad ante la inducción de procesos patológicos, se ha dado especialmente para cirugías y el control de fármacos (Benavides & Guénet, 2003).

Este modelo, utilizado en el bioterio, es de tamaño pequeño (figura 1), teniendo como medidas externas: 130 a 198 mm de largo total, que va desde la punta de la nariz hasta la punta de la cola. En los adultos, los machos tienen un peso de entre 38 a 42 g en promedio y pueden diferenciarse de las hembras por el abultamiento testicular notorio en la pared abdominal. Presentan una frecuencia cardiaca de 325-780 ppm, una frecuencia respiratoria de 60 a 230 rpm, su temperatura corporal es de 35.5 a 38 °C y su periodo de vida es de 1 a 1.3 años (Martínez Castillo, 1997).

Los ratones deben estar en micro-ambientes permisibles para su buen desarrollo y reproducción. Los componentes de temperatura, humedad, composición gaseosa y particularmente del aire, deben ser aceptables en el medio del encierro tanto primario como secundario. El material utilizado para la cama debe estar libre de químicos, polvo y microorganismos; la comida (pellets o nutricubos) y el agua se suministran *ad libitum* (a libertad) (Vargas Miranda, Bárbara; Ambriz García, Demetrio; Navarro Maldonado, María del Carmen; Trejo Córdova, Alfredo; Rodríguez Esquivel, Gabriela; González Vieira, 2018).



Figura 1. Ratón cepa CD1 (*Mus musculus domesticus*), imagen obtenida de "Manejo de animales de Bioterio de la UAM-I" (17).

Esta cepa ha permitido su utilización en diversos estudios. Algunos de ellos, los han utilizado para administrarles estreptozotocina (STZ) con el objetivo de expresar sus efectos diabetogénicos en los ratones, tanto en la inyección intraperitoneal (para estudios de diabetes tipo 1 y 2), como intracerebroventricular (para el estudio de la EA o diabetes tipo 3). Por mencionar algunos ejemplos, Ventura-Sobrevilla et.al., en 2011 (Ventura-Sobrevilla et al., 2011), realizaron un estudio en este modelo para conocer la dosis indicada para el desarrollo de la hiperglicemia similar a la diabetes tipo 1 y 2; por su parte, Furman en 2015 (Furman, 2015) utilizó la administración STZ para evaluar los efectos diabetogénicos en estos roedores, demostrando que el ratón CD1 es óptimo para el estudio de los diferentes tipos de diabetes; y, en los últimos años este modelo ha sido ampliamente utilizado con este objetivo.

### **3. El modelo esporádico de estreptozotocina intraverebroventricular STZ-icv**

#### **3.1 Estreptozotocina**

La estreptozotocina (2-desoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos)) es un medicamento obtenido de la bacteria *Streptomyces achromogenes*. Es un antibiótico que posee propiedades antitumorales, razón por la cual es utilizada en el tratamiento de determinados tumores. Este compuesto diabetogénico citotóxico es conocido por inducir estrés nitrosativo dentro de la célula, actúa selectivamente sobre las células productoras/secretoras de insulina y causan resistencia o disminución de la misma, así como, alteraciones en la señalización del receptor de insulina y, con ello, hiperglucemia (Furman, 2015).

Inicialmente, la acción del fármaco se investigó en modelos para inducir diabetes mellitus, mediante la administración periférica de STZ, la cual causa daño en las células  $\beta$  pancreáticas. Posteriormente, se empezó a utilizar la administración de manera intracerebroventricular en roedores para alterar el funcionamiento de enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa cerebral y alterar la vía insulina/IGF, induciendo el estado de resistencia a la insulina y fallo en el metabolismo de la glucosa cerebral, generando con ello, un modelo animal que simula las alteraciones cerebrales presentes en los modelos sAD (Mishra, Singh, Shukla, & Shukla, 2018).

#### **3.2 Antecedentes del modelo STZ-icv**

El profesor Sigfried Hoyer es el pionero del modelo STZ-icv (1994). El razonamiento del profesor partió de que en sAD existe una disminución del consumo cerebral de oxígeno y glucosa, sin embargo, la caída del consumo de oxígeno es desproporcionadamente menor, esto lo condujo a la hipótesis de que la mayor perturbación bioquímica en sAD se debe a

alteraciones en el metabolismo de la glucosa cerebral, que posteriormente da lugar a alteraciones en la señalización insulínica (Hoyer, Muller, & Plaschke, 1994). A esto le sumó sus observaciones en ratas Wistar macho adultas a las que les realizó la administración STZ-icv y, en los cuales, encontró características similares a la EA (presencia de ovillos neurofibrilares, placas seniles, neuroinflamación, aumento del estrés oxidativo, disminución en la permanencia en el cuadrante objetivo y aumento de la latencia de escape en la tarea del laberinto acuático de Morris, entre otras.). A partir de este punto, inició a realizar varios estudios con la administración STZ-icv para alterar el control del metabolismo cerebral de glucosa/energía. Con sus experimentos, ha demostrado que la inyección de STZ en los ventrículos laterales de los roedores, disminuye la utilización de glucosa cerebral, principalmente en la corteza frontal y parietal, así mismo, disminuye las concentraciones de ATP y fosfocreatina, la relación ATP/ADP y el potencial de carga de energía en la corteza cerebral. A esto, varios autores han sumado evidencia de que las consecuencias neuroquímicas y neuropatológicas de la inyección STZ-icv, también tiene repercusión en hipocampo (Grieb, 2016).

Hoy en día está bien documentado que el mecanismo primario de STZ-icv que se da al perturbar la señalización de la insulina cerebral, desensibiliza los receptores de insulina neuronales y los efectores posteriores, incluida la fosfoinositido 3 quinasa (PI3K), la proteína quinasa B (AKT), el glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), lo que induce hiperfosforilación de la proteína tau, formación de depósitos de A $\beta$ , alteración del metabolismo intracerebral de glucosa y energía, y otros cambios neuropatológicos, tales como, un estado de estrés oxidativo y neuroinflamación, que son similares a los observados en la EA esporádica y, que eventualmente causan disfunción cognitiva (Li et al., 2016).

Se ha descrito que la inyección STZ-icv en ratas genera alteraciones en múltiples niveles (cognitivo, neuroquímico, estructural y ultraestructural). Estudios en estos modelos animales, han demostrado: déficits cognitivos (déficits de memoria y aprendizaje), degradación sináptica (regulación a la baja de proteínas sinápticas sinaptofisina y espinofilina) (Wu et al., 2018), estrés oxidativo, anormalidades mitocondriales severas, polarización microglial al fenotipo M1 "proinflamatorio" (Lu et al., 2017), hipometabolismo de la glucosa, déficit en el sistema colinérgico, astrogliosis, formaciones difusas similares a placas de A $\beta$ 1-42, hiperfosforilación de la proteína tau en hipocampo CA1 y acumulación de A $\beta$  en la microvasculatura cerebral (angiopatía amiloide cerebral, CAA) (Knezovic et al., 2015).

La investigación en torno a la inducción de la EA mediante la inyección STZ-icv en ratones ha sido menormente estudiada, sin embargo, entre los efectos que se han descrito están: resistencia a la insulina cerebral, disminución en el metabolismo de la glucosa cerebral,

déficits colinérgicos, acumulación de A $\beta$  y proteína tau, estrés oxidativo, neuroinflamación (astroglisis y activación microglial) y déficits en memoria (a corto plazo y espacial) y aprendizaje (Chen et al., 2013; Mishra et al., 2018).

Los cambios cognitivos y neuroquímicos desencadenados por las inyecciones STZ-icv siguen un patrón dependiente del tiempo, la dosis y el momento de la inducción, que consta de tres fases. En la primera fase, se desarrolla una respuesta aguda, durante la segunda, se produce una tendencia a volver a los valores normales y, finalmente, en la fase tres, se produce una fase de descompensación con un agravamiento lento y progresivo. Esta evolución temporal de la patología iniciada por la inyección de STZ (simple o doble) en los ventrículos laterales parece asemejarse a la situación en la vida real que no existe en los modelos EA de ratones transgénicos (Grieb, 2016).

En un estudio llevado a cabo en ratones CD1, se demostró que con una única inyección intraperitoneal de dosis alta (130 o 150 mg/kg de peso corporal), desde el tercer día de la inducción, se produce una severa hiperglucemia y pérdida de peso, similar a la diabetes tipo 1, así, también se demostró que varias dosis bajas (2, 3, 4 o 5 de 40mg/kg de peso corporal) produce hiperglucemia leve, con signos similares a la diabetes tipo 2 (Ventura-Sobrevilla et al., 2011). Además, Dong Li., et. al., demostraron que una única dosis intraperitoneal de 150 $\mu$ g/ratón afecta el rendimiento cognitivo y, en dosis más bajas, como 75  $\mu$ g/ratón se ve afectada la plasticidad sináptica, genera pérdida neuronal en hipocampo y en corteza cerebral, lo que sugiere que una dosis baja es suficiente para representar un posible modelo de la enfermedad (Li et al., 2016).

La dosis de 3 mg/kg icv ha sido ampliamente utilizada para la inducción de la enfermedad en roedores, ya sea en una única inyección (Chen et al., 2013, 2012; Rodrigues et al., 2010) o en una doble inyección, con 24 horas de diferencia entre ambas dosis, generando una dosis total de 6 mg/kg (Mishra et al., 2018; Rai, Kamat, Nath, & Shukla, 2014). Por su parte, Zappa-Villar M. et. al., en 2018, demostraron, mediante una única administración STZ-icv de 1 mg/kg en un grupo de ratas y 3 mg/kg en otro, que la dosis de 3 mg/kg es eficiente para causar el déficit cognitivo similar a la sAD, en contraste con la dosis de 1 mg/kg la cual no lo logró, sin embargo, ambas dosis fueron suficientes para generar una pérdida de ramificaciones completas en CA1 y CA3. Esto sugiere que 3 mg/kg son suficientes para iniciar el proceso neuropatológico y así obtener un modelo similar a la EA.

Estos estudios y otros más, han demostrado pérdida de neuronas del hipocampo, lo cual podría explicar el deterioro de la memoria, incluso en las etapas más tempranas de la EA. A través de análisis patológicos, se han encontrado cambios neuropatológicos definitivos en el hipocampo. Tanto en CA1 como en giro dentado (GD), existe una disminución significativa del número y densidad de las neuronas después de la inducción STZ-icv (Li et al., 2016).

## 4. Astrocitos hipocampales

Durante años, la investigación respecto a desórdenes neurológicos se ha centrado en el estudio fisiológico y patológico de las neuronas, sin embargo, en los últimos años ha crecido enormemente el interés en las propiedades de los astrocitos, por lo cual, también ha incrementado la información y conocimiento acerca de ellos en sus posibles papeles ante lesiones cerebrales, ya sea por accidentes traumáticos, eventos vasculares cerebrales, infecciones, alteraciones metabólicas, enfermedades neurodegenerativas (EA, Parkinson, etc.), entre otras (Álvarez-Tostado, 2012).

La neuroglia fue descrita por primera vez por Virchow en 1846, sin embargo, su estudio se vio relegado hasta la década de 1980. Las células de la glía (del griego glía: pegamento, unión), constituyen la mayor parte de las células del sistema nervioso, en el ratón, el 65% y en el ser humano, hasta el 90% (Guillamón-Vivancos, Gómez-Pinedo, & Matías-Guiu, 2015). Y se clasifican según su morfología, función y localización en: I) Microglía, las únicas células gliales de origen inmunitario; II) Astrocitos; III) Células de Schwann y oligodendrocitos, que forman capas de mielina alrededor de los axones en el sistema nervioso periférico y central, respectivamente; y, IV) Ependimocitos, los cuales revisten los ventrículos y el canal ependimario en la médula espinal, creando la barrera hematoencefálica (BHE) y segregando además líquido cefalorraquídeo (LCR) (Fernández, 2015).

A pesar de que los astrocitos son las células gliales más abundantes (constituyen el 25% del volumen cerebral), se descubrieron hasta finales del siglo XIX. Estas células poseen una forma estrellada (motivo al cual se debe su nombre), con una estructura celular ramificada, a los cuales se les denomina “procesos” (figura 2) (Kimmelberg & Norenberg, 1989). Inicialmente se pensaba que fungían únicamente como células de soporte para las neuronas, sin embargo, actualmente se sabe que sus funciones son múltiples y, que tienen un papel clave en la fisiología normal, en el desarrollo del cerebro y en la patología del sistema nervioso, debido a su papel crucial en la neuroinflamación. Por lo tanto, el papel de los astrocitos en el cerebro es proteger de todas las formas contra la lesión del SNC y para reparar el tejido nervioso después de una lesión (Frost & Li, 2017).

En función de su morfología, fenotipo antigénico y localización, los astrocitos se clasifican en: I) protoplásmicos y, II) fibrosos. Los primeros, se encuentran en la sustancia gris, sus procesos envuelven tanto sinápsis (alrededor de 100,000 cada astrocito), como vasos sanguíneos y presentan una morfología globosa, con varias ramas principales que dan lugar a procesos muy ramificados con distribución uniforme. Y, los segundos, se localizan en la sustancia blanca, contactan con los nodos de Ranvier y vasos sanguíneos y su ramificación es menor, con procesos más alargados a modo de fibras (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

A pesar de que los astrocitos no generan potenciales de acción, son células excitables con propiedades de comunicación: se activan por señales internas y externas y envían mensajes específicos a las células vecinas (gliotransmisión). Esta comunicación se da gracias a aumentos transitorios de la concentración de calcio intracelular, lo que permite la comunicación astrocito-astrocito y astrocito-neurona. Además, como consecuencia del aumento de  $Ca^{2+}$ , los astrocitos liberan gliotransmisores al espacio extracelular que inducen corrientes mediadas por receptor en neuronas y son conducidos también a los astrocitos vecinos. Esta señalización mediada por calcio sugiere que los astrocitos tienen un papel activo en el control de la transmisión sináptica, que discutiremos más adelante (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

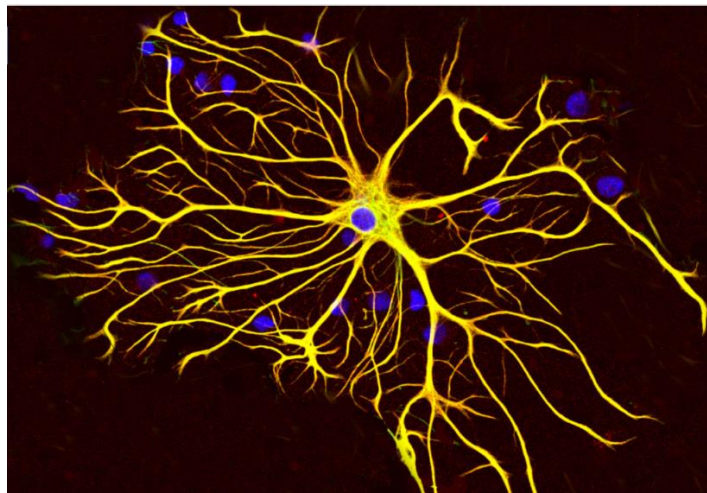


Figura 2. Representación de un astrocito, en el que se puede apreciar su forma estrellada con sus múltiples procesos dendríticos.

#### 4.1 Función

Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso. Los axones en crecimiento son guiados hacia sus objetivos mediante moléculas guía derivadas de astrocitos, además, estas células participan activamente en la sinaptogénesis tanto en el desarrollo, como tras una lesión del sistema nervioso central (se ha sugerido que contribuyen en la plasticidad cerebral, construcción de nuevos circuitos y en la reconstrucción de los mismos tras lesión) (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

El papel de los astrocitos en el control de la función sináptica, por su parte, ha sido ampliamente estudiado y reportado. Estas células son capaces de detectar la actividad sináptica mediante receptores específicos y responden a ella con la liberación de gliotransmisores (moléculas sinápticamente activas) los cuales pueden producir excitabilidad neuronal, además de oleadas de calcio, favoreciendo así la comunicación (Salgado Puga, K. G., García Colunga J., López Hidalgo M., 2006). La interacción entre

neuronas (pre y postsinápticas) y astrocitos se ha denominado “sinapsis tripartita”, en la cual los astrocitos tienen un papel directo e interactivo en la actividad sináptica y son indispensables para el correcto procesamiento de la información en los circuitos cerebrales. Esta idea propone que, los astrocitos son partes integrales y funcionales que se encargan de suministrar soporte trófico y metabólico y de mantener el control homeostático cerebral para asegurar una función neuronal y sináptica apropiadas a través de la regulación de los niveles extracelulares de iones y neurotransmisores (Fernández, 2015).

Los procesos más finos de los astrocitos se encuentran rodeando a las sinapsis, por ejemplo, en el *stratum radiatum* del hipocampo más del 50% están rodeadas por procesos astrocíticos (Fernández, 2015). Por todo lo anterior, los astrocitos participan en la correcta actividad sináptica mediante el mantenimiento de la homeostasis del fluido intersticial sináptico; envolviendo a la sinapsis y manteniendo los niveles adecuados de pH, iones, neurotransmisores y fluido; y, liberando factores de crecimiento y citoquinas que ejercen efectos más potentes y prolongados sobre la sinapsis (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

Otro factor importante, es que astrocitos presentan un pie vascular y uno neuronal generando así una unión entre neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos (unión neurovascular), la homeostasis de esta unión es fundamental para la función cognitiva y su alteración (por astrogliosis reactiva, por ejemplo) podría estar relacionada con alteraciones cognitivas como la EA (Guillamón-Vivancos et al., 2015). Por su parte, las oleadas de calcio se relacionan con aumentos en la microcirculación vascular ya que liberan mediadores como prostaglandinas E, óxido nítrico o ácido araquidónico, los cuales tienen efectos vasodilatadores o vasoconstrictores, por ello éstas células tienen una función importante en la regulación del flujo sanguíneo (Álvarez-Tostado, José L., 2012).

Este intricado sistema de conexiones neurovasculares, permite que los astrocitos ejerzan control sobre muchas funciones cerebrales necesarias, incluida la regulación de la BHE (influyen en su polaridad mediante sus propiedades de barrera en las células endoteliales); realizan la entrega de nutrientes al tejido nervioso; captan la glucosa de la circulación y proporcionan a las neuronas metabolitos energéticos; constituyen la principal reserva de gránulos de glucógeno en el SNC; almacenan sustancias precursoras para la formación de neurotransmisores; regulan el equilibrio de iones y metabolitos que permiten la actividad eléctrica neuronal; regulan el estrés oxidativo; y, juegan un papel importante en el metabolismo lipídico y la secreción de lipoproteínas (Frost & Li, 2017). En el humano, el cerebro es el órgano más rico en colesterol. El desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (como la EA), están estrechamente relacionadas con el metabolismo de los lípidos y los niveles de colesterol, en los cuales tiene un importante papel la glía ya que, las lipoproteínas y el colesterol en el SNC no proceden de la sangre periférica, sino

que, son sintetizados por la glía, especialmente por los astrocitos (Álvarez-Tostado, José L., 2012; Guillamón-Vivancos et al., 2015).

Por último, su papel en la neurogénesis adulta. Las células madre neuronales se encuentran presentes en la zona subventricular (SVZ, por sus siglas en inglés) y en el giro dentado, éstas generan nuevas neuronas, las cuales migran hasta el bulbo olfatorio en donde se diferencian. La migración se lleva a cabo en cadenas rodeadas por procesos astrocitarios y utilizan como andamiaje la red de vasos sanguíneos, debido a esto, se ha demostrado que los astrocitos “orquestan” la formación y reorganización estructural de este andamiaje vascular mediante la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular. Además, las células madre de la SVZ, también llamadas células B, expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), y tienen morfología y ultraestructura de astrocitos (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Kimelberg & Norenberg, 1989).

## **4.2 Astrogliosis reactiva**

El término de astrogliosis, hace referencia a un proceso en el que se genera neuroprotección y aislamiento de tejido dañado mediante la formación de una cicatriz glial y eliminación de patógenos del SNC. Cuando existe una lesión en el SNC, existen cambios a nivel molecular, celular y funcional en los astrocitos (astrogliosis reactiva). El impacto de la astrogliosis reactiva en la enfermedad es complejo: los astrocitos reactivos pueden ser tanto perjudiciales como beneficiosos para las células circundantes y pueden empeorar o resolver la lesión inicial del SNC (Frost & Li, 2017). En particular, los astrocitos reactivos son necesarios para la formación de cicatrices, lo que ayuda a contener la propagación de las células inflamatorias y también para reparar las agresiones a la barrera hematoencefálica, así mismo, captan glutamato potencialmente excitotóxico, liberan glutatión para contrarrestar el estrés oxidativo, degradan péptido  $\beta$ -amiloide, limitan la difusión de células inflamatorias y agentes infecciosos (Frost & Li, 2017; Guillamón-Vivancos et al., 2015).

Por otro lado, los astrocitos reactivos pueden ser neurotóxicos cuando producen especies reactivas de oxígeno (ROS) o algunas citocinas inflamatorias. La investigación sobre los mecanismos que regulan el equilibrio entre cuándo la gliosis reactiva es neuroprotectora y cuándo es neurotóxica es fundamental para comprender la consecuencia funcional de los astrocitos reactivos en la EA (Frost & Li, 2017).

En la astrogliosis reactiva existen cambios a nivel molecular, celular y funcional en los astrocitos y, se puede observar, dependiendo de su severidad: aumento de la expresión de GFAP, hipertrofia tanto de los cuerpos celulares, como de sus procesos, poca o ninguna proliferación y, en casos más severos, presencia de cicatriz glial la cual puede inhibir la regeneración axonal y la migración celular (Guillamón-Vivancos et al., 2015).



### **4.3 La proteína ácida fibrilar glial (GFAP)**

Existen diferentes clases de filamentos intermedios reconocidos actualmente, los cuales se encargan de mantener las propiedades estructurales del citoesqueleto, tienen propiedades en la transducción de señales biomecánicas y moleculares. Estos filamentos se han clasificado en 6 tipos, según su homología de secuencia, todos con una ultraestructura similar (Middeldorp & Hol, 2011). La GFAP es el filamento intermedio tipo III clave en los astrocitos (figura 3), debido a que es el componente fundamental de sus redes y, es el marcador clásico para la identificación inmunohistoquímica de ellos. Es responsable del mantenimiento de la fuerza mecánica y el engrosamiento y elongación de los procesos astrocíticos durante la activación en respuesta a una lesión del SNC (astrogliosis) (Eng, 1985; McKeon & Benarroch, 2018). Si bien, GFAP puede compartir algunas propiedades químicas, físicas e inmunológicas similares con otras clases de proteínas de filamentos intermedios, posee algunas epítomos únicos altamente inmunogénicos (Eng, Ghirnikar, & Lee, 2000).

En respuesta a cualquier tipo de trauma en el SNC, los astrocitos proliferan y aumentan tamaño, sus procesos se vuelven más grandes y hay un aumento sustancial de filamentos gliales y, por consiguiente, un aumento de GFAP, así mismo, la expresión de esta proteína aumenta progresivamente con la edad. Debido a esto, la inmunohistología de GFAP se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de tumores astrocíticos, el estudio del desarrollo de astrocitos, de la gliosis astrocítica, de la regeneración y trasplante del SNC y de enfermedades neurodegenerativas (Eng, 1985).

El rol de la función de GFAP en los astrocitos normales se ha observado en: I) la mitosis, regulando el ensamblaje de filamentos requeridos para la citoquinesis; II) en la regulación de la proliferación astrocítica y de células de Schwann en respuesta a la lesión; III) en la regulación del tráfico vesicular, incluyendo el movimiento de vesículas que liberan diferentes gliotransmisores vía exocitosis, reciclaje vesicular y autofagia medida por lisosomas; IV) puede contribuir con la modulación astrocítica de la plasticidad sináptica; V) en el mantenimiento de los procesos de pies astrocíticos para inducir las propiedades de la BHE en células endoteliales y en el mantenimiento de la mielinización normal del SNC (McKeon & Benarroch, 2018).

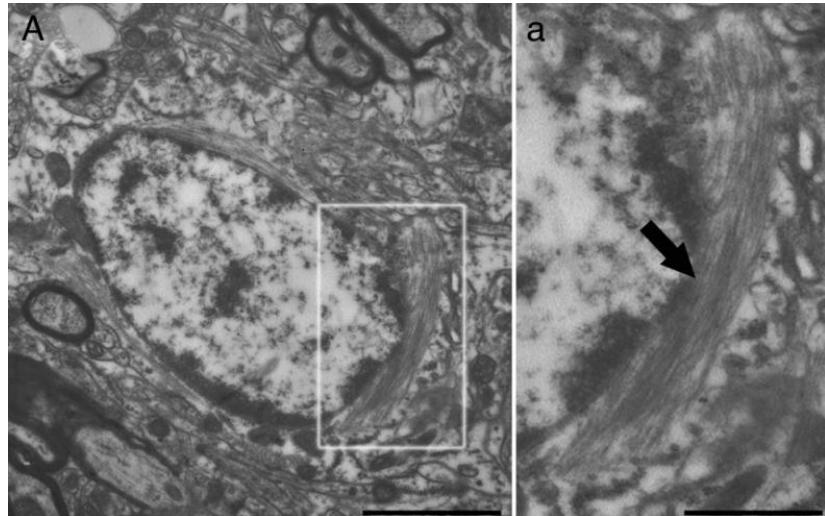


Figura 3. Imagen de microscopía electrónica donde se muestra un astrocito (A). Es posible apreciar la riqueza en filamentos intermedios (a, flecha), constituidos entre otras, por la proteína ácido fibrilar glial (GFAP). Barras A = 2 micras; a = 0,5 micras (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

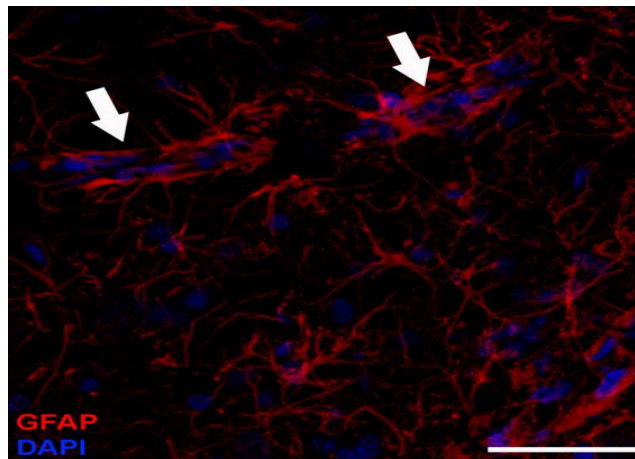


Figura 4. Inmunohistoquímica contra GFAP, en donde se aprecia la morfología estrellada de los astrocitos (rojo), los capilares cerebrales rodeados casi en su integridad por los pies terminales de las fibras astrocitarias (flechas) y los núcleos celulares (azul). Imagen de microscopia confocal. Barra = 70 micras (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

#### 4.4 Astrocitos en la Enfermedad de Alzheimer

Existe evidencia de la implicación de los astrocitos en los procesos patológicos subyacentes a la EA, esta proviene de la observación realizada en diversos estudios en los que muestran: I) que éstas células gliales están asociadas con placas seniles en el cerebro de los pacientes

con EA (Fakhoury, 2017), lo que puede afectar su señalización desencadenante y la función sináptica (Santello et al., 2019); II) presencia de astrogliosis profunda en el cerebro de modelos animales y pacientes con EA (en tejido post-mortem), donde los astrocitos reactivos se acumulan alrededor de las placas amiloides a través de la fagocitosis de dendritas y sinapsis degeneradas locales, rodeando los depósitos de A $\beta$  a manera de cicatrización glial, además, el grado de astrogliosis se ha relacionado con el deterioro cognitivo (Frost & Li, 2017); III) tras la activación por A $\beta$  o después de una señal de daño o lesión, los astrocitos participan en la secreción de citocinas inflamatorias (IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF-b), lo que promueve los procesos neurodegenerativos en la EA (Fakhoury, 2017); IV) la alteración de la unión neurovascular debido a la astrodegeneración, puede generar alteraciones neuronales y con ello perjudicar sus funciones; V) existe una pérdida de funciones fisiológicas complejas en los astrocitos, tales como, soporte neuronal, suministro de sustrato energético y regulación del equilibrio iónico (Garwood et al., 2017); VI) se liberan especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno lo que favorecen a la neuroinflamación, entrando en un ciclo vicioso y, VII) hay cambios en la homeostasis del calcio que conducen a una sobrecarga de calcio y una reducción en la depuración de glutamato y otros neurotransmisores que resultan en sinaptotoxicidad (Rowland, Hooper, & Kellett, 2018)

Se cree que el número de astrocitos permanece constante a lo largo de la EA, sin embargo, las poblaciones que se encuentran próximas a las placas A $\beta$ , se vuelven reactivos y, un gran número de astrocitos se atrofian o pierden volumen y superficie de área, con una disminución en sus procesos (astrodegeneración). En modelos de roedores, se ha observado astrodegeneración en las cortezas prefrontal, entorrinal e hipocampo, en etapas tempranas de la enfermedad, incluso antes de la presencia de A $\beta$  y, más tarde, en las últimas etapas de la enfermedad, la presencia de A $\beta$  desencadena una respuesta astrogliosis secundaria al activar los astrocitos, lo que da como resultado una astrogliosis reactiva en las áreas que rodean las placas (Frost & Li, 2017).

Si bien el campo de la EA hasta la fecha se ha centrado un tanto en las neuronas, las implicaciones de la disfunción de los astrocitos en la EA sugieren que la adición de líneas de investigación en torno a ellos, sería de beneficio real en los intentos de modelar la EA.

#### **4.5 Astrocitos en el aprendizaje y la memoria**

Debido a los múltiples avances en el conocimiento de la importancia de los astrocitos en el SNC, también ha aumentado el interés en ellos, por lo que, recientemente se ha empezado a documentar el papel de estas importantes células en funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria. Se ha demostrado que los métodos que involucran habilidades motrices (ejercicio) y cognitivas (aprendizaje) en conjunto, como el caso del laberinto

acuático de Morris (LAM), resultan en un incremento de neurogénesis en el giro dentado, así mismo, se han relacionado con un aumento en el número, la densidad y ramificación de procesos de astrocitos (Jahanshahi et al., 2008).

Estudios recientes han vinculado la señalización de astrocitos a niveles sinápticos o de red con el desempeño cognitivo en animales y, han proporcionado evidencia directa de que el procesamiento cognitivo requiere una actividad coordinada de conjuntos sinápticos y astrocitos (Santello et al., 2019). Por lo tanto, estudiar el número de estas importantes células, puede ayudar al estudio de su grado de participación en la memoria, ya que, se ha descrito que el aumento de sinapsis está relacionado con el aumento de astrocitos, sin embargo, aún no está bien establecido los mecanismos de dicha relación (Jahanshahi et al., 2008).

Existe evidencia de que la comunicación astrocito-sinapsis presente en tantos circuitos del SNC, podría considerarse un contribuyente universal a las funciones sináptica y, la actividad oscilatoria de la red y la remodelación plástica de los circuitos sinápticos subyacentes forman la base de la codificación de la memoria y otras funciones cognitivas. A su vez, las funciones cognitivas surgen de procesos que involucran la actividad coordinada de conjuntos de neuronas, circuitos sinápticos y astrocitos (Santello et al., 2019).

Por otra parte, la integración de nuevas herramientas quimiogénicas y optogénicas en la investigación de astrocitos, ha permitido activar las vías intracelulares y, de esa manera, incrementar la comprensión de la capacidad de los astrocitos de modular selectivamente la actividad de las neuronas vecinas en la amígdala y el cuerpo estriado y producir potenciación a largo plazo (PLP) en el hipocampo. Este reclutamiento de vías de señalización intracelular, está comenzando a arrojar información sobre la compleja participación de los astrocitos en la memoria. Por ejemplo la activación del receptor glial Gq en el CA1 del hipocampo, durante la adquisición de la tarea, da como resultado una memoria reciente mejorada, mientras que la activación de Gs la deteriora, este hallazgo y otros más, apuntan a la importancia de los astrocitos en la memoria y sobre todo, en el aprendizaje (Kol et al., 2020).

La participación de los astrocitos en la formación de la memoria dependiente del hipocampo, ha sido vinculada con diversas vías: I) La producción de L-lactato por parte de los astrocitos. En un estudio se suprimió la PLP en CA1 y CA3 del hipocampo y con ello se deterioró la formación de memoria a largo plazo, lo cual, se revirtió con la administración de L-lactato exógeno. El mismo deterioro se produjo por la caída de los transportadores de monocarboxilato (MCT) que transportan L-lactato desde los astrocitos (MCT1 y MCT4) a las neuronas (MCT2), además, una de las funciones neuronales que requieren L-lactato es la síntesis de proteínas de *novo* que mantiene la PLP y fomenta la consolidación de la memoria

(Santello et al., 2019); II) La modulación de reclutamiento neuronal en la proyección CA1-corteza cingulada anterior (CCA). Los astrocitos tienen un papel activo en el reclutamiento masivo de neuronas de CA1 que proyectan a la CCA, por lo cual realizar una manipulación astrocítica específica que genere una alteración en su función, se evita el reclutamiento exitoso al CCA durante el aprendizaje de una tarea (Kol et al., 2020); III) El efecto noradrenérgico mediado por astrocitos. Se conoce que la noradrenalina potencia la PLP y la memoria del hipocampo, a través de la acción que tiene sobre los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  (expresados en astrocitos) y, que, estos a su vez generan estímulos que conducen a la producción de L-lactato durante el procesamiento de la memoria, por tanto, la desactivación específica de astrocitos a los receptores  $\beta_2$ , evita la consolidación de la memoria, efecto rescatado por el suministro de L-lactato al hipocampo (Santello et al., 2019); IV) Su control en la disponibilidad de D-serina para la activación sináptica de NMDAR. La señalización a través de los receptores nicotínicos CB1Rs de los astrocitos, afecta a la memoria dependiente del hipocampo al aumentar la activación de NMDAR mediada por D-serina en las sinapsis de CA3-CA1. Además, la delección de los receptores CB1 astrocíticos reduce la ocupación del sitio de unión de NMDAR, suprimiendo la PLP en CA1 del hipocampo y, deteriorando así la memoria de reconocimiento (Adamsky et al., 2018; Santello et al., 2019).

Por lo anterior, se ha demostrado que la activación de los astrocitos mejora la memoria espacial y contribuye a su consolidación al aumentar la actividad neuronal durante una tarea en la que involucre el aprendizaje. Estos hallazgos de que los astrocitos inducen plasticidad y facilitan la memoria y el aprendizaje, pueden tener importantes implicaciones clínicas para los tratamientos de mejora cognitiva. (Adamsky et al., 2018).

## **5. El hipocampo**

El hipocampo es una estructura subcortical que deriva de la región medial del telencéfalo, forma una invaginación del giro parahipocampal, localizado en el cuerno inferior del ventrículo lateral, es parte del sistema límbico y tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial, la consolidación de la memoria y la regulación de emociones (Hammond, 2015; Knierim, 2015). Esta estructura de forma alargada y curva está presente en todas las especies de mamíferos. En los humanos, se encuentra profundamente en el lóbulo temporal y corre a lo largo de un eje posterior hacia anterior, su forma se asemeja a un caballito de mar, razón por la cual se inspiraron en esa criatura marina para su nombre; mientras que, en los roedores, esta estructura es relativamente grande y se asemeja a un anacardo, localizado en posición rostro-caudal hacia el lóbulo temporal (figura 5) (Knierim, 2015; Strange, Witter, Lein, & Moser, 2014).

## 5.1 Composición anatómica

Anatómicamente, el hipocampo está organizado en el cuerno de Amón (dividido en áreas: CA1, CA2, CA3 y CA4), el hilus, el giro dentado, el complejo subicular (*presubiculum*, el *subiculum* y el *parasubiculum*) y la corteza entorrinal (Olivares, Juárez, & García, 2015). CA1 es el campo hipocámpico más grande y se localiza en la división superior en la interfaz del hipocampo y subículo, en la zona más distal al GD y próxima a CA3, se conoce también como sector de Sommer o sector vulnerable, debido a que sus neuronas piramidales son muy sensibles a la anoxia e isquemia. CA2 y CA3 se hallan en la división inferior dentro del hipocampo. CA4, por su parte, constituye la zona de transición entre el cuerno de Amón y el giro dentado (Adel K. Afifi, 2006).

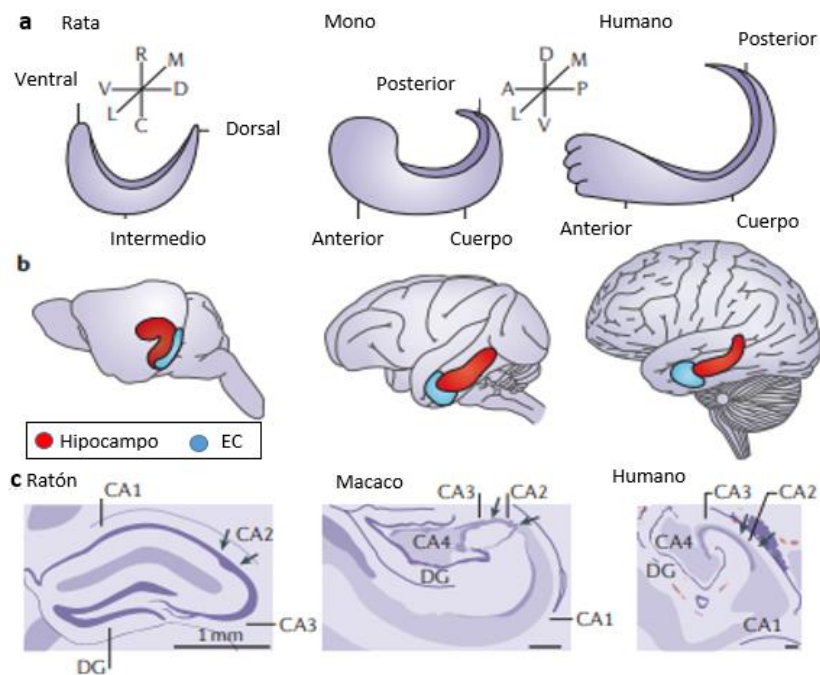


Figura 5. Anatomía del hipocampo en diferentes especies. a) ilustración esquemática de la orientación del eje largo del hipocampo en rata, mono y humano; b) eje largo completo del hipocampo (rojo), corteza entorrinal (azul); c) secciones transversales de Nissl del hipocampo de ratón, mono y humano. A, anterior; C, caudal; D, dorsal; DG, giro dentado; L, lateral; M, medial; P, posterior; R, rostral; V, ventral. Modificado de "The adult hippocampal network" (Hammond, 2015).

El cuerno de Amón es una estructura curva, tiene una organización laminar con cinco capas: *stratum alveus*, *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum* (llamado así debido a la organización radial de las dendritas apicales de todas las células piramidales), *stratum lacunosum moleculare* y *stratum moleculare* (figura 6). Debido a su forma de U, las capas (y las celdas piramidales) están al revés en CA1 en comparación con CA3 (Hammond,

2015). La población neuronal del hipocampo se encuentra organizada en tres capas mayores o principales: molecular, piramidal y polimórfica. Las células piramidales, están presentes principalmente en los cuernos de Amón (CA1 y CA3); las células granulares, se encuentran distribuidas en el giro dentado; las células musgosas, intrínsecas y de canasta se encuentran distribuidas en el área del hilus; además entre un 10 a 15% de la población neuronal total, está integrada por las interneuronas, presentes en todas las regiones del hipocampo (Adel K. Afifi, 2006; Bello-Medina, González-Franco, & Medina Andrea, 2018).

Las células principales (piramidales) tienen su soma alineado en una capa delgada llamada *stratum pyramidale*, tres troncos dendríticos emergen del soma (uno apical y dos basales). Las dendritas apicales se extienden en el *stratum radiatum* y se arborizan en el *stratum lacunosum moleculare*, por su parte, las dendritas basales se ramifican en el *stratum oriens* y, los axones corren en el *stratum alveus*, donde emiten numerosas colaterales antes de salir del hipocampo (Hammond, 2015).

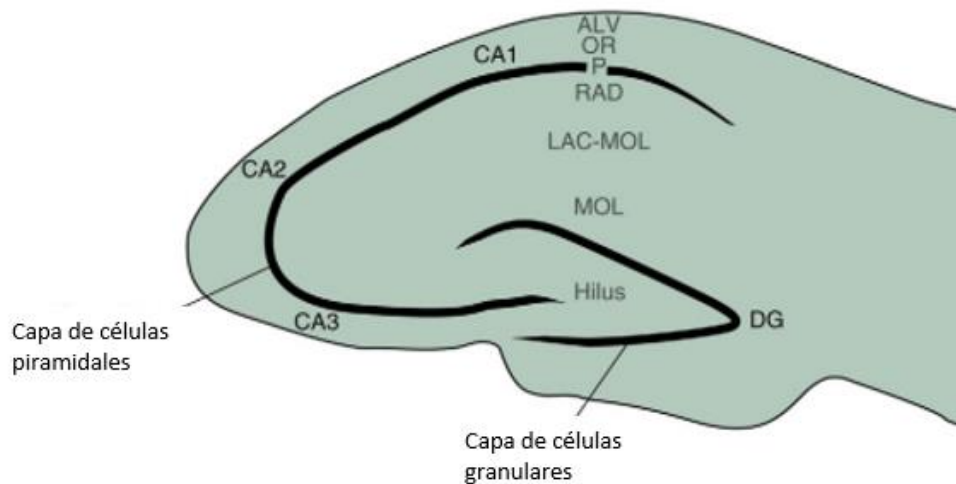


Figura 6. Estructura del hipocampo de ratona. Organización laminar de las capas en el cuerno de Amón. DG: Giro dentado, ALV: stratum alveus, OR: stratum oriens, P: stratum pyramidale, RAD: stratum radiatum, LACMOL: stratum lacunosum moleculare, MOL: stratum moleculare. Modificado de "The adult hippocampal network" (Hammond, 2015).

## 5.2 Conectividad

La mayor aferencia extrínseca a la formación hipocámpica proviene de la corteza parahipocámpica que es la principal vía de entrada de aferencias neocorticales de procesamiento provenientes de distintas áreas (corteza parietal posterior, corteza retrosplenial, corteza prefrontal dorsolateral y parte dorsal del surco temporal superior); estas aferencias son distribuidas hacia la corteza entorrinal, la cual, proporciona la mayor fuente de aferencias al hipocampo con sus proyecciones hacia el GD, así también, es el

objetivo de sus eferencias, actuando como el mayor “interfaz” entre el hipocampo y otras partes del cerebro (Olivares et al., 2015).

El GD, el CA1 y el CA3 constituyen el circuito o bucle trisináptico del hipocampo (figura 7), cuyo primer relevo lo constituye la proyección cortico-hipocampal denominada como “vía perforante”, a través de la cual, las células de la capa II de la corteza entorrinal, envían sus axones (atravesando la capa de células piramidales del *subículum*) hasta el GD y CA3 (sinapsis 1). Además, las células de la capa III, envían información hacia CA1 a través de la vía temporoammonica (Bello-Medina et al., 2018; Knierim, 2015).

El segundo relevo, ocurre entre el GD y el CA3, a través de la vía de las fibras musgosas; las neuronas granulares del GD proyectan sus axones hacia las células piramidales del CA3 (sinapsis 2). En el tercer relevo, las neuronas piramidales de CA3 envían sus axones hacia las piramidales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer (sinapsis 3). Finalmente, las neuronas piramidales del CA1 proyectan sus axones hacia el subículo y desde ahí retorna la información hacia la corteza entorrinal, completando el bucle. Por otra parte, los axones provenientes de la región CA3 proyectan hacia todo el hipocampo mediante proyecciones comisurales, entre hemisferios y/o asociativas, en el mismo hemisferio; y, las células del giro dentado también proyectan a las células musgosas del hilus e interneuronas hilares que, a su vez, envían proyecciones excitatorias e inhibitorias respectivamente, hacia las neuronas granulares (Bello-Medina et al., 2018; Olivares et al., 2015).

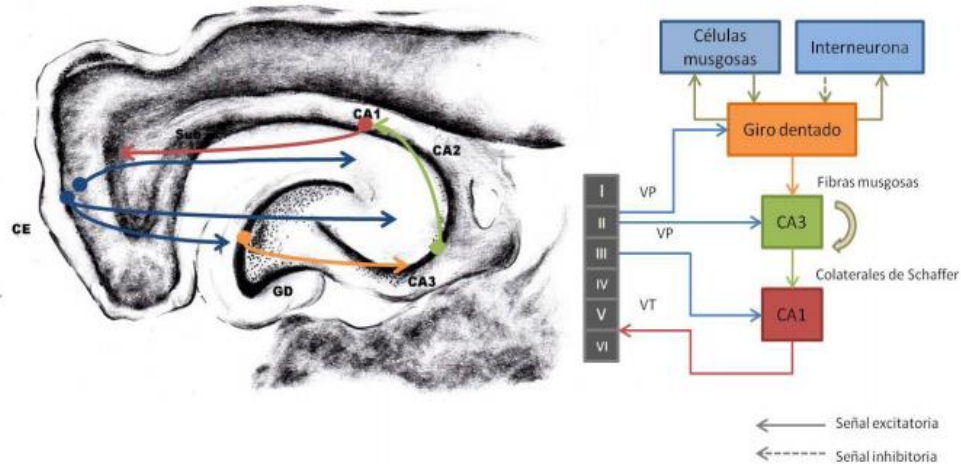


Figura 7. Esquema de los circuitos en el hipocampo adulto. La vía excitatoria trisináptica (CE-GD-CA3-CA1-CE) es descrita por flechas de colores (azul: vía perforante, naranja: vía de fibras musgosas, verde: colaterales de Schaffer, roja: proyecciones hacia CE) (Olivares et al., 2015).



### 5.3 Neuroquímica

Los principales neurotransmisores liberados en el hipocampo son: el glutamato (GLU), el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), la acetilcolina (ACh), la noradrenalina (NA) y la serotonina (5-HT). Las células piramidales utilizan el glutamato como neurotransmisor, sin embargo, su actividad está modulada no solo por las aferencias glutamatérgicas, sino también por las que provienen de las interneuronas inhibitoras locales. Se han identificado cuatro tipos principales de interneuronas inhibitoras en los cuernos de Amón, todas GABAérgicas: I) células de cesta, sus somas se encuentran en el *stratum radiatum* e inervan el soma y dendritas proximales ubicadas en los *stratum pyramidale* y *radiatum*; II) células bistratificadas, sus somas están presentes en los *stratum oriens*, *radiatum* y *pyramidale*, e inervan a las dendritas apicales y basales en su parte proximal de los *stratum radiatum* y *oriens*; III) células de *oriens-lacunosum moleculare*, sus somas se encuentran en el *stratum oriens* e inervan las dendritas apicales distales del *stratum lacunosum moleculare*; y, IV) células axo-axónicas (o de candelabro), su soma se encuentra cerca o dentro del *stratum pyramidale* e inervan exclusivamente en segmento inicial del axón. Además, existen aferencias GABAérgicas provenientes del septum, que inervan a las interneuronas del hipocampo (Bello-Medina et al., 2018; Hammond, 2015).

Además de la regulación de la excitabilidad de células individuales, el GABA desempeña un papel importante ya que proporciona una entrada inhibitoria oportuna, estableciendo una ventana temporal que permite la excitación sináptica y la posterior iniciación del potencial de acción, sincronizando así el flujo de información aferente y eferente. Por otra parte, la inervación noradrenérgica del hipocampo es relativamente rica y se origina exclusivamente en el *locus coeruleus*, participando principalmente en interacciones no sinápticas. También hay presencia de aferencias colinérgicas provenientes del septum medial y la banda diagonal de Broca en el hipocampo y, la inervación serotoninérgica se origina en el núcleo medial del rafe y una proyección menor proveniente del rafe dorsal (Bello-Medina et al., 2018).

### 5.4 Función

El hipocampo ha sido asociado a diferentes funciones. Inicialmente se sostenía la hipótesis de que el hipocampo estaba implicado en el olfato, sin embargo, actualmente ha sido refutada esa teoría. Posteriormente, en 1953, el neurocirujano William Beecher Scoville, en colaboración con el Dr. Wilder Penfield y la Dra. Brenda Milner mediante observaciones en algunos pacientes con lesiones en estas áreas, establecieron que estas regiones neurales son responsables de la formación de memorias. A partir de ahí muchos investigadores se han centrado en el estudio de pacientes con deterioro de la memoria y, mediante autopsias cerebrales, han concluido que las lesiones de las zonas temporales mediales (incluido el

hipocampo), son las responsables de la afectación del aprendizaje y de la formación de memorias recientes (Bello-Medina et al., 2018; Knierim, 2015).

Hoy en día existe amplia evidencia del papel crítico que juega el hipocampo en la memoria declarativa. Las lesiones severas del hipocampo conducen a una gran dificultad en la formación de nuevos recuerdos (amnesia anterógrada), y muchas veces también se ven afectados los recuerdos formados antes de la lesión (amnesia retrógrada). Sin embargo, el daño al hipocampo no afecta a todos los tipos de memoria, se ha demostrado preservación de la memoria no declarativa que involucra habilidades motoras (procedimental) y la de trabajo (Bello-Medina et al., 2018; Olivares et al., 2015).

Otro ámbito en donde existe gran evidencia del papel del hipocampo, es en la memoria espacial, la cual consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar la información acerca de rutas y localizaciones especiales (Olivares et al., 2015). Diversos estudios en roedores, han demostrado que existen cuatro tipos de neuronas espaciales: I) las células de lugar (presentes en CA1 y CA3), las cuales, desencadenan potenciales de acción cuando el animal pasa por un lugar concreto en su entorno; II) las células de dirección de la cabeza, las cuales se activan cuando el animal dirige su cabeza en una dirección particular; III) las células de rejilla, activadas en ubicaciones que abarcan todo el entorno; y IV) las células sensibles a los límites, que se activan a lo largo de barreras ambientales que generan barreras al movimiento (Bello-Medina et al., 2018). El descubrimiento de ellas, condujo a la teoría de que el hipocampo puede actuar como un mapa cognitivo, dando una representación neural del esquema espacial del entorno, por lo tanto, la integridad de la funcionalidad del hipocampo es indispensable para las tareas de memoria espacial, las cuales involucren actividades que precisen encontrar caminos hacia un objetivo oculto (Knierim, 2015; Olivares et al., 2015).

La evidencia obtenida mediante los estudios preclínicos realizados en modelos animales, se relacionan y justifican la sintomatología presente en los pacientes con EA, los cuales presentan sensación de extravío, además de dificultad en la formación de nuevos recuerdos (amnesia anterógrada) y, afectación en la formación de recuerdos pocos años antes de la lesión (amnesia retrógrada), conservando en su mayoría, los recuerdos más antiguos.

Otros estudios también sustentan la participación de esta estructura en el procesamiento de información de carácter no espacial, así como en tareas de componente emocional. Toda la información recabada mediante la variedad de estudios realizados, han demostrado que el hipocampo juega un papel muy importante en diversos procesos cerebrales, tales como, la ubicación espacial, el procesamiento de información emocional y el aprendizaje y la memoria (Bello-Medina et al., 2018; Moser & Moser, 1998).

El circuito trisináptico (anteriormente mencionado), está presente en todas las especies de mamíferos y se mantiene a lo largo del eje. A pesar de que es un circuito intrínseco conservado, las porciones dorsal y ventral tienen diferentes conectividades con áreas corticales y subcorticales, por lo tanto, se ha propuesto que funcionalmente existen diferencias entre el hipocampo dorsal y el ventral (Fanselow, 2011; Strange et al., 2014).

## **6. Sobreentrenamiento cognitivo**

La navegación espacial tanto en entornos nuevos como familiares, es sumamente importante en diversos repertorios conductuales para los animales (búsqueda de alimento, conducta reproductiva, regreso al nido, etc.), y para que ella se lleve a cabo de una manera óptima, el aprendizaje y la memoria espacial son habilidades vitales e indispensables (Vicens, Redolat, & Del Carmen Carrasco, 2003). Estas habilidades cognitivas se basan en estrategias de aprendizaje tanto egocéntricas (ubicación de estímulos periféricos en referencia al cuerpo del observador), como allocéntricas (representaciones espaciales independientes del observador, en las cuales el ambiente es el marco de referencia). Tanto en humanos como en roedores, se cree que la memoria allocéntrica depende del hipocampo y la memoria egocéntrica, del núcleo caudado del estriado, y ambas se ven reforzadas (mostrando un claro incremento en la capacidad de aprendizaje espacial y memoria) al presentar una exposición repetida a la misma tarea, es decir, el sobreentrenamiento o la sobreexposición a una tarea conductual, puede repercutir a nivel estructural y/o funcional en la estructura encargada de realizar dicha tarea (Kealy et al., 2008).

El sobreentrenamiento se refiere a la exposición de un gran número de ensayos de una misma prueba durante varios días, este sobreentrenamiento ha demostrado que los roedores con lesiones hipocampales mejoran su rendimiento, llegando incluso a mostrar una búsqueda bastante localizada durante la prueba, y con ello, acercarse a los parámetros demostrados en roedores sanos (Morris, Schenk, Tweedie, & Jarrard, 1990). Para que un animal aprenda la tarea, es necesario únicamente un día de entrenamiento en el cual se apliquen varios ensayos en dicha tarea, por lo tanto, un mayor número de días de entrenamiento, con sus respectivos ensayos por día, se considera sobreentrenamiento (Ramírez-Amaya, Escobar, Chao, & Bermúdez-Rattoni, 1999).

Para evaluar la memoria espacial en modelos animales, se somete al animal a una tarea en la cual su solución dependa de la información espacial disponible (Vicens et al., 2003). El modelo más comúnmente empleado en roedores es el laberinto acuático. El LAM es una de las tareas más utilizadas en la neurociencia del comportamiento para estudiar los procesos psicológicos y los mecanismos neuronales del aprendizaje espacial y la memoria (O'Keefe, 1976). Así, también se han realizado diversos estudios en los que aplican un test virtual semejante al LAM en adultos con alguna lesión hipocampal y los resultados apuntan a que

presentan graves dificultades en la retención y adquisición del aprendizaje espacial, así como la solución de la tarea (Olivares et al., 2015).

### **6.1 Laberinto acuático de Morris**

El laberinto acuático fue diseñado por R.G. Morris en 1980 para evaluar la memoria espacial en ratas, con el objetivo de observar si al colocar en un laberinto en el cual las ratas tuvieran que nadar en lugar de correr, podía ser una forma útil de examinar la memoria espacial e investigar así el significado funcional de las células de lugar del hipocampo recientemente descubiertas. Actualmente es un método ampliamente utilizado, se realiza la prueba de entrenamiento (prueba de plataforma oculta) seguido de una prueba de sonda espacial (sin plataforma) tanto en protocolos de pruebas como en entrenamiento (Vicens et al., 2003).

Esta prueba tiene diversas ventajas: no se requiere de la privación de alimento o agua, ni de la aplicación de una descarga eléctrica para motivar la conducta, se requieren relativamente pocos ensayos ya que el animal aprende rápido la tarea mediante el uso de las claves extralaberínticas, además, en este laberinto se evita que los animales utilicen claves no espaciales, como el olor para resolver la tarea y las estrategias de aprendizaje son fáciles de detectar y cuantificar (D'Hooge & De Deyn, 2001; Vicens et al., 2003).

### **6.2 Impacto del sobreentrenamiento cognitivo en modelos animales**

Morris et. al., en 1990, realizaron un experimento en ratas, en el cual aplicaron un sobreentrenamiento en el laberinto acuático, demostrando que durante la prueba de sonda (al retirar la plataforma) las ratas controles normales o con una lesión simulada, nadan hasta el cuadrante objetivo y permanecen en él el mayor tiempo, mientras que, las ratas con lesiones en hipocampo, subículo o combinadas, no lo hacen. Sin embargo, el sobreentrenamiento en ratas con lesiones hipocampales (principalmente) y en subículo, puede resultar en patrones de búsqueda bastante enfocados, acercándose a lo observado en las ratas controles (figura 8). Así mismo, el sobreentrenamiento muestra cambios significativos en cuanto a la latencia de escape, porcentaje de tiempo de entrenamiento en el cuadrante objetivo y cruces hacia el cuadrante objetivo de los grupos con lesión hipocampal y subicular en comparación a los parámetros observados en la fase de adquisición, acercándose a los parámetros del grupo control (figura 9) (Morris et al., 1990).

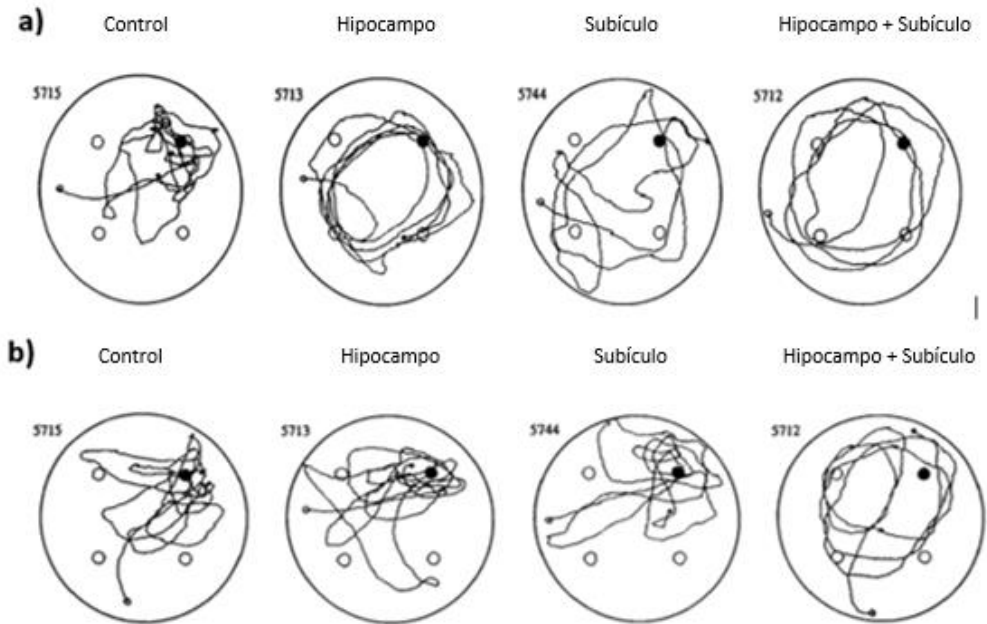


Figura 8. a) Patrón de búsqueda de la plataforma durante la fase de adquisición. Grupos con lesión de hipocampo, subículo y combinado, se muestran desorientados, teniendo dificultades en la localización de la plataforma en comparación con el grupo control; b) Patrón de búsqueda de la plataforma posterior al sobreentrenamiento. Los grupos de lesión de hipocampo y subículo pasan la mayor parte del tiempo buscando el cuadrante objetivo y son casi tan precisos como los controles. Grupo hipocampo + subículo continúa con desorientación en la localización de la plataforma. Modificado de Morris et. al. 1990 (Morris et al., 1990).

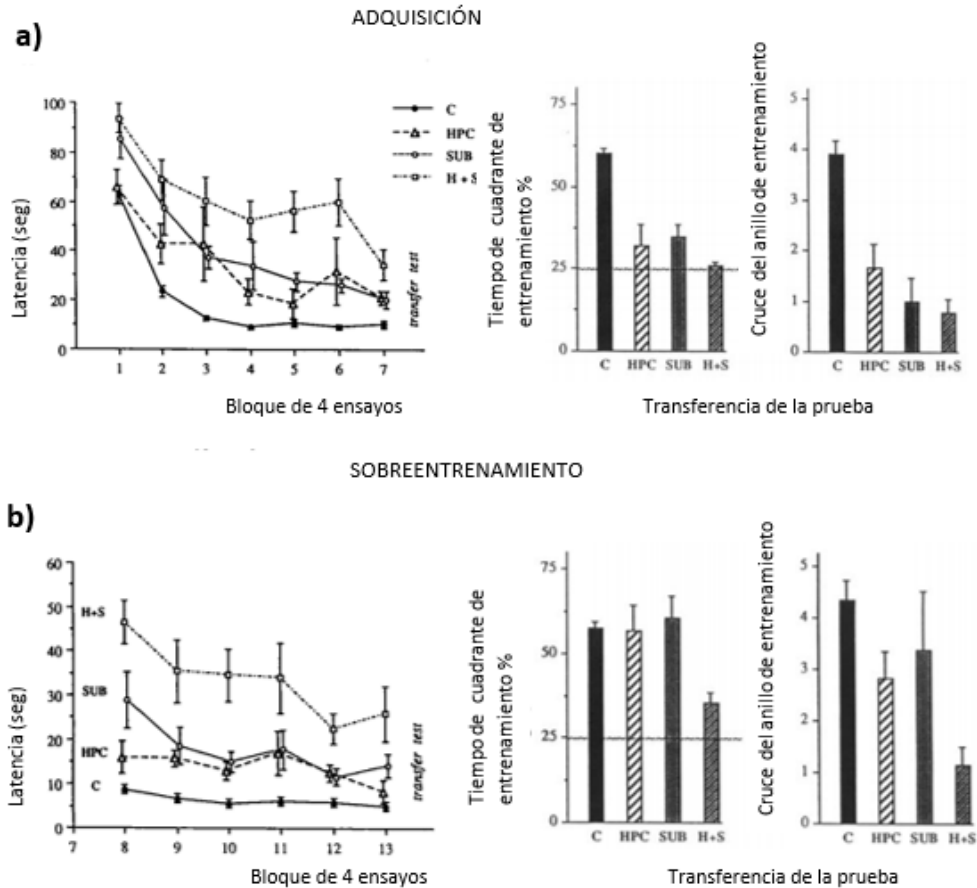


Figura 9. Grupos: C: control; HPC: lesión hipocampal, SUB: lesión subicular; H+S: lesión combinada (hipocampo +subículo). a) Fase de adquisición, se muestra una rápida adquisición en el grupo control, sin embargo, un aprendizaje significativamente más lento en los grupos lesionados, representado con un aumento en la latencia de escape y una disminución en el tiempo y cruces en el cuadrante objetivo en comparación con el grupo control; b) Post sobreentrenamiento, se muestra una disminución en la latencia de escape y un aumento en el cuadrante objetivo en HPC y SUB, similares al C. Grupo HPC + SUB muestra mejoría, sin embargo, continúa gravemente afectado. Modificado de Morris et. al., 1990 (Morris et al., 1990).

Por otro lado, diversos tipos de evidencia apuntan a que pueden ocurrir eventos plásticos tales como, cambios en la estructura, distribución y número de sinapsis en el hipocampo después de exponer a los animales a una tarea de aprendizaje espacial y se ha sugerido que estos cambios morfológicos subyacen al proceso de consolidación de la memoria y, que permite el almacenamiento de información en el sistema nervioso central (Ramírez-Amaya, Balderas, Sandoval, Escobar, & Bermúdez-Rattoni, 2001). Se ha observado que existen cambios en la distribución de sinapsis en CA1 y CA3 del hipocampo y que la ramificación dendrítica incrementa después de someter a los animales a un ambiente complejo, como el laberinto acuático de Morris. Esta inducción de nuevas sinapsis se ha observado

principalmente en animales que se sometieron a varias sesiones de entrenamiento, lo que sugiere que la sinaptogénesis está relacionada con el sobreentrenamiento. Este efecto se ha observado principalmente en la región septal del hipocampo dorsal y disminuye gradualmente hacia el polo temporal. (Ramírez-Amaya et al., 2001; Ramírez-Amaya et al., 1999).

Se ha descrito también que el sobreentrenamiento en la tarea del LAM (3 días de entrenamiento con 8 ensayos por día), puede modificar la densidad de excrescencias espinosas en las dendritas basales de neuronas piramidales en CA3 del hipocampo. Estos estudios de los cambios estructurales en el eje dendrítico después de un sobreentrenamiento, puede proporcionar información esencial sobre los mecanismos de plasticidad sináptica estructural subyacentes a la adaptación funcional de los circuitos del hipocampo para procesar eficientemente la información espacial (Gómez-Padilla et al., 2020).

Ramírez-Amaya et. al., en 1999 publicaron los resultados de un estudio que realizaron, en el cual, sometieron a un grupo de roedores a diferentes protocolos de entrenamiento en el LAM (un día-WM1, dos días-WM2, tres días-WM3; con 10 ensayos por día) y sus grupos controles (control nado-SC, tarea de evitación inhibitoria-IA y el control intacto-IC), y examinaron (mediante microscopía electrónica y óptica), la evidencia de sinaptogénesis de fibras musgosas en los estratos *lucidum* y *oriens* del hipocampo. Observaron que el patrón de tinción de Timm en las fibras musgosas de CA3 se alteró drásticamente en WM3, los gránulos teñidos se observaron bilateralmente en el *stratum oriens* (figura 10) de la mayoría de los animales sobreentrenados, pero no en los animales de grupos SC, IA, IC. Así mismo, el análisis densitométrico cuantitativo reveló que WM3 presentó un área significativamente mayor de gránulos teñidos en comparación con los demás grupos; y WM2 fue mayor que WM1, sin embargo, no fue significativo. Estos resultados muestran que no ocurre una sinaptogénesis detectable en CA3 después de un día de entrenamiento o de una conducta de aprendizaje estresante, pero sí en un sobreentrenamiento de una tarea relacionada con el espacio y, que estos cambios podrían estar mediados por una activación fisiológica de la formación del hipocampo (Ramírez-Amaya et al., 1999).

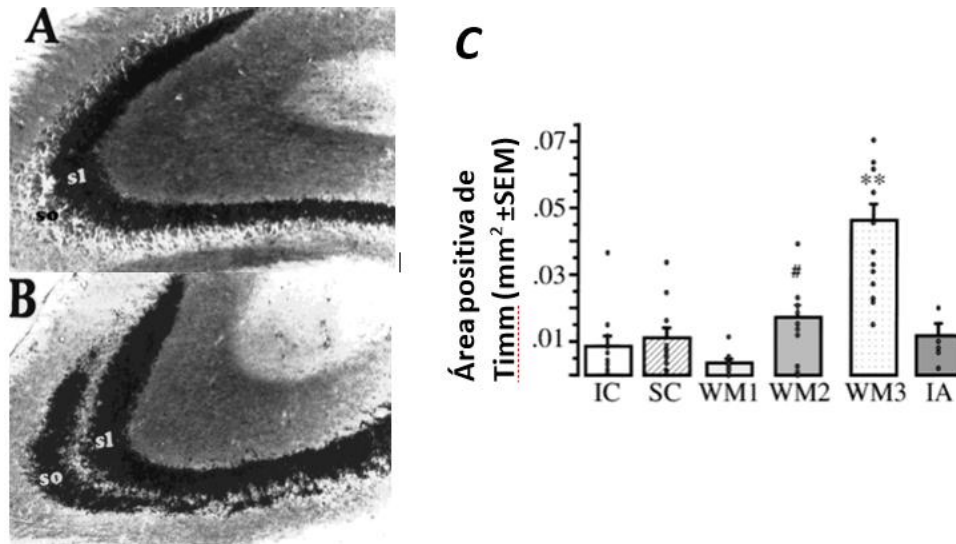


Figura 10. Microfotografías representativas de cortes coronales del hipocampo de ratas en las que se muestran las fibras musgosas teñidas en el *stratum lucidum* (sl) y *stratum oriens* (so) del grupo control de nado (A) y del grupo entrenado 3 días en el LAM (B); en ellas se puede observar evidencia de sinaptogénesis en el *stratum oriens* de CA3 únicamente en el grupo sobreentrenado. C) Resultados del análisis con tinción de Timm. El gráfico muestra el área media de Timm positivo del *stratum oriens* en: control intacto (IC); control de nado (SC); animales entrenados para tarea de aprendizaje espacial, 1 (WM1), 2 (WM2) y 3 días (WM3); y animales de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria (IA). Se muestra una diferencia significativa en el área positiva de tinción (indicador de sinaptogénesis) en el grupo WM3 en comparación con los demás grupos. Modificado de Ramírez-Amaya, 1999 (Ramírez-Amaya et al., 1999).

Para continuar con su investigación Ramírez, et. al., en 2001 publicaron los resultados de otro estudio en el que pretendían establecer la relevancia de la sinaptogénesis de fibras musgosas para la memoria espacial, para lo cual, evaluaron el rendimiento de la memoria espacial a largo plazo de animales entrenados en el LAM, probándolos a los 7 y 30 días posteriores al entrenamiento. Para este estudio, utilizaron 51 ratas que dividieron en siete grupos: cinco de entrenamiento, agrupados dependiendo el número de días de entrenamiento (1 día-WM1, 2 días-WM2, 3 días-WM3, 4 días-WM4 y 5 días-WM5; cada día se realizaron 10 ensayos) y dos controles (control de nado-CN y control intacto CI). Consideraron el sobreentrenamiento cuando el rendimiento de los animales se estabilizó en un nivel asintótico. Los resultados de su estudio revelaron que existe un aumento sustancial de la proyección de fibras musgosas al *stratum oriens* en animales que recibieron sobreentrenamiento en el LAM (figura 11), y su desempeño en las pruebas de memoria (figura 12) se relaciona positivamente con esto, lo que sugiere una correlación funcional entre la sinaptogénesis y la formación de la memoria espacial. Esta mejora notable se observó en la prueba realizada a los 7 días, sin embargo, a pesar de que a los 30 días, hubo



una disminución funcional, los cambios continuaron siendo significativos (Ramírez-Amaya et al., 2001)

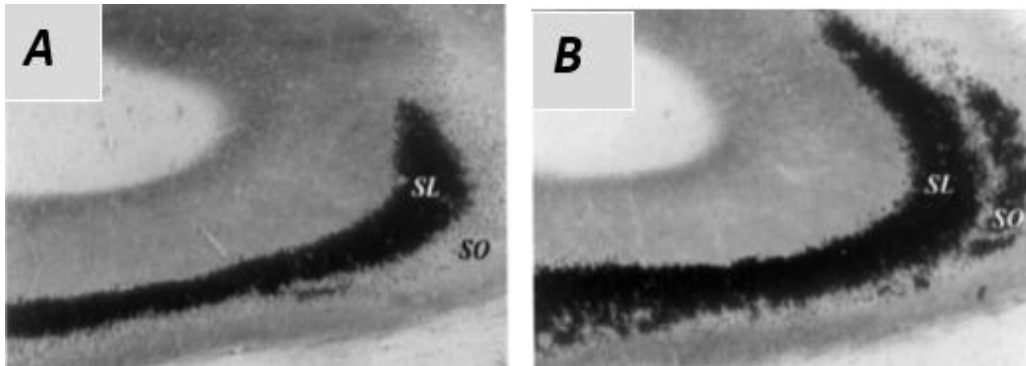


Figura 11. Microfotografía de CA3 del hipocampo. Tinción de Timm en *stratum lucidum* (SL) y *stratum oriens* (SO), en animales de grupo control de nado (A) y en el grupo WM5 (B). Muestra un aumento sustancial de la proyección de fibras musgosas al *stratum oriens* en animales que recibieron sobreentrenamiento en el LAM. Modificado de Ramírez-Amaya 2001 (Ramírez-Amaya et al., 2001).

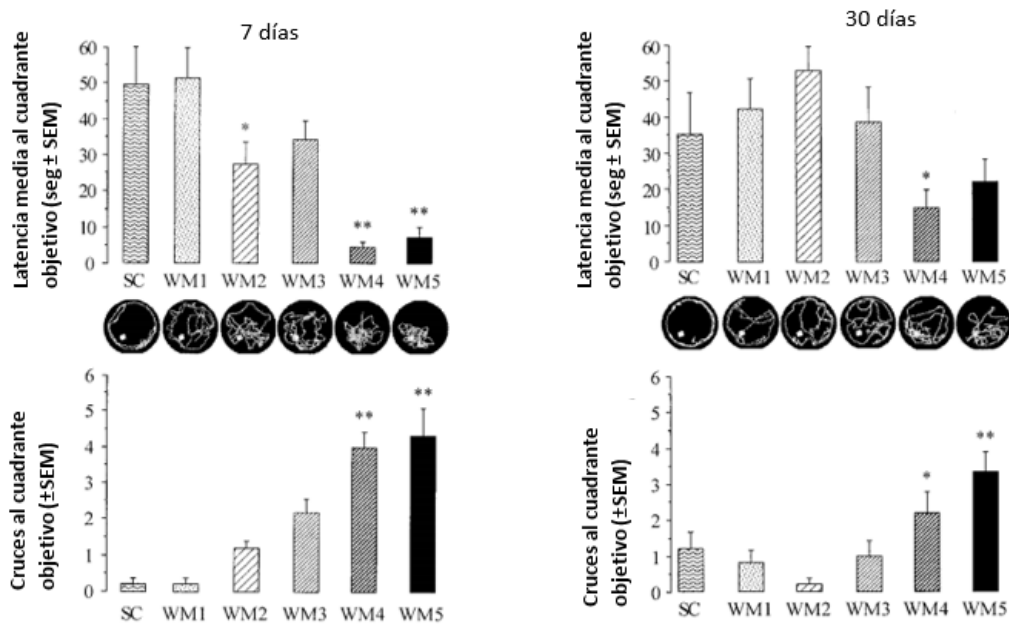


Figura 12. Resultado de la prueba de sonda en LAM de los grupos SC: control de nado; WM1:1 día; WM2:2días; WM3:3 días; WM4:4 días; WM5: 5 días de entrenamiento. En las gráficas superiores, se muestra la latencia media al cuadrante objetivo y, en las inferiores, el número de cruces al cuadrante objetivo. Se observa una diferencia significativa en los parámetros de los grupos con sobreentrenamiento en comparación con los demás grupos, tanto a los 7 días como a los 30 días. Modificado de Ramírez 2001 (Ramírez-Amaya et al., 2001).

Por su parte, Gómez-Padilla, et. al., en 2019 realizaron un estudio con el objetivo de dilucidar si una o tres sesiones de entrenamiento en el LAM podían modificar las excresencias espinosas de diferentes tipos de espinas dendríticas en las dendritas basales de neuronas piramidales de CA3 del hipocampo. Su principal hallazgo en este estudio fue que encontraron un aumento significativo en la densidad de excresencias espinosas del tipo racimo, observado en el segmento proximal de las dendritas basales CA3, siete días después del sobreentrenamiento, por lo cual, puede considerarse que esta plasticidad estructural sináptica es un cambio a largo plazo. Este cambio estructural podría aumentar la probabilidad de la formación de nuevas conexiones, además, cabe destacar que las espinas y racimos se encontraron en el segmento proximal de la dendrita, la cual, es una ubicación anatómica crítica importante para desencadenar el potencial de acción, ya que es la región más cercana al montículo del axón (Gómez-Padilla et al., 2020).

En otro estudio, Mishra et. al., en 2018, administraron dos dosis STZ-icv de 3mg/kg (una en cada ventrículo) en los días 1 y 3 a ratas macho Sprague Dawley y, aplicaron un entrenamiento de 3 sesiones de entrenamiento en el LAM (una por día, con 4 ensayos cada una). Los resultados que obtuvieron: I) disminución en la latencia de escape en el grupo control en la 2° sesión de entrenamiento, pero no en el grupo STZ, sin embargo, en la 3° sesión si se manifestó una disminución de la latencia de escape por parte de ambos grupos; II) en el grupo STZ sin intervención conductual se mostró un aumento de GFAP en la zona subventricular e hipocampo (presencia de neuroinflamación) (Mishra et al., 2018).

Estos estudios muestran que, el sobreentrenamiento cognitivo puede ser una estrategia útil para aminorar el efecto negativo que produce una lesión en hipocampo o subículo, debido a los cambios plásticos en el SNC, mejorando la capacidad de aprendizaje y memoria espacial, e intentando acercarse a los parámetros de animales sin lesión. Además, el sobreentrenamiento de los animales en una tarea de laberinto de agua se puede utilizar como modelo para investigar los mecanismos funcionales implicados en la codificación de la memoria espacial a largo plazo (Morris et al., 1990; Ramírez-Amaya et al., 1999). A pesar de que cada vez es mayor la información y evidencia en torno a este modelo, es necesario continuar con la investigación para dilucidar aún más los mecanismos implicados.

## JUSTIFICACIÓN

La EA es el tipo de demencia más común en México y el mundo, con una alta tasa de discapacidad y mortalidad. Entre los factores de riesgo más significativos que se han asociado con el desarrollo de la enfermedad se encuentran: la diabetes, el síndrome metabólico, la obesidad, el sedentarismo y la depresión; comorbilidades altamente frecuentes en la población mexicana. A pesar de ser una enfermedad que genera un problema de salud prioritario, su etiología sigue siendo desconocida, por lo tanto, la investigación en torno a ella es de suma importancia, tanto en el conocimiento de su causa, como en el desarrollo de métodos de intervención.

Se ha demostrado una asociación entre la neuroinflamación y la EA, en modelos animales, se ha encontrado que los astrocitos juegan un papel importante en el desarrollo de la EA, a través de distintas vías: astrodegeneración (alteración en los procesos y en su densidad), alteración en la función fisiológica y de unión neurovascular de los astrocitos, así como alteraciones en la señalización y función sináptica dependiente de astrocitos. Además, en condiciones normales, se ha demostrado que el aumento de la sinapsis está relacionado con el aumento de la densidad de astrocitos y en conjunto con las neuronas son indispensables para favorecer las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria. Por lo tanto, estudiar el papel de los astrocitos en el desarrollo de la enfermedad, puede ser un recurso importante en la ampliación del conocimiento de los procesos subyacentes a la EA, sin embargo, el estudio de estos procesos celulares en humanos, es imposible.

Con el objetivo de responder a preguntas que antes eran imposibles de examinar en humanos, se han generado modelos animales (tanto transgénicos, como inducidos) que reflejan las condiciones patológicas de la enfermedad. Los modelos inducidos, han demostrado varias ventajas frente a los modelos transgénicos, éstos permiten mimetizar la EA de tipo esporádico, no requieren manipulación genética y, es posible dar seguimiento desde el momento preciso del daño cerebral inducido. Por otro lado, permite evaluar el potencial de diversas intervenciones tanto de prevención como de progresión de la enfermedad.

El estudio en torno al modelo STZ-icv ha sido medianamente estudiado en ratas, sin embargo, en ratones es prácticamente nulo y, hasta donde tenemos conocimiento y hemos investigado, no se ha realizado ningún estudio en que se observe los cambios en la densidad y en la morfología de los astrocitos en el hipocampo en este modelo de sAD. Por otro lado, está bien documentado que tanto el entrenamiento físico, como el sobreentrenamiento cognitivo resultan beneficiosos en la intervención de las demencias (en específico de la EA),

debido a sus efectos a nivel sináptico, en la neurogénesis, entre otros. Por todo esto, en esta tesis se propone estudiar el efecto de una estrategia de intervención cognitiva, utilizando el sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris, sobre la densidad y morfología de los astrocitos ubicados en el hipocampo dorsal y si la recuperación de estos puede contribuir a la reversión del deterioro cognitivo observado en el aprendizaje espacial. Este estudio podrá dar una aproximación a un método de intervención en el cual se pueda involucrar en conjunto el sobreentrenamiento cognitivo junto con el entrenamiento físico.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La administración de STZ-icv inducirá un deterioro en el aprendizaje espacial, en la densidad y morfología de los astrocitos ubicados en los estratos *radiatum* y *oriens* en el CA1 del hipocampo y podrá ser revertido utilizando el sobreentrenamiento cognitivo en el LAM?

## **HIPÓTESIS**

1. La administración STZ-icv producirá un deterioro en el aprendizaje espacial en un entrenamiento de una sesión en el LAM.
2. El sobreentrenamiento cognitivo (tres sesiones) en el LAM producirá un aprendizaje moderado en el grupo STZ-icv.
3. La administración STZ-icv producirá una disminución en la densidad y una atrofia en los astrocitos ubicados en los estratos *radiatum* y *oriens* del CA1 del hipocampo.
4. El sobreentrenamiento cognitivo (tres sesiones) en el LAM producirá una reversión de la disminución de la densidad y atrofia de los astrocitos ubicados en los estratos *radiatum* y *oriens* del CA1 del hipocampo en el grupo STZ-icv.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la administración de STZ-icv y del sobreentrenamiento cognitivo en el LAM, sobre el aprendizaje espacial, la densidad y la morfología de los astrocitos ubicados en los estratos *radiatum* y *oriens* de CA1 en el hipocampo dorsal.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la administración STZ-icv sobre el aprendizaje espacial, en un modelo animal.
- Evaluar el efecto de la administración STZ-icv sobre la densidad y la morfología de los astrocitos ubicados en los estratos *radiatum* y *oriens* de CA1 en el hipocampo dorsal de un modelo animal.
- Evaluar el efecto de una o tres sesiones de entrenamiento en el LAM, sobre el aprendizaje espacial, tanto en roedores con EA inducida, como en roedores sanos.
- Evaluar el efecto de una o tres sesiones de entrenamiento en el LAM, sobre la densidad de astrocitos en los estratos *radiatum* y *oriens* en CA1 del hipocampo de un modelo animal con EA esporádica, así como en un modelo animal sano.
- Evaluar el efecto de una o tres sesiones de entrenamiento en el LAM, sobre la morfología de los procesos en los estratos *radiatum* y *oriens* en CA1 del hipocampo de un modelo animal con EA esporádica, así como en un modelo animal sano.

## METODOLOGÍA

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México y se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (SEMARNAT, 2011).

### Sujetos, material y método

Se utilizaron 54 ratones macho de la cepa CD1, con un peso entre 27 y 41 g, de 10 semanas de edad, obtenida en el bioterio del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron asignados de manera aleatoria a diferentes grupos (tabla 1). Se colocaron cuatro animales por caja (cajas de acrílico (12 x 12 x 25 cm), con tapas de acero inoxidable y lámina galvanizada). Se alojaron con agua y comida (pellets) *ad libitum*, en un cuarto con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con luz invertida (12 horas de luz artificial a partir de las 19:00 h). La temperatura de la habitación se mantuvo controlada en  $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Los animales permanecieron 7 días en un cuarto en el laboratorio para su habituación antes del inicio de la fase experimental. En la figura 13 se muestra una representación global de la cronología de la metodología.

Tabla 1. Se muestra la distribución conductual por grupo y condición experimental (el número dentro del paréntesis, indica el número total de animales asignados a cada grupo). VEH: inyección intracerebroventricular vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial); STZ: inyección intracerebroventricular estreptozotocina; BIO: Grupo control en Bioterio, sin intervención; CN: Grupo control de nado, sin tarea conductual; LAM1: grupo con una sesión de entrenamiento en el LAM; LAM3: grupo con tres sesiones de entrenamiento en el LAM.

VEH-icv	BIO (4)	CN (4)	LAM1 (8)	LAM3 (8)
STZ-icv	BIO (4)	CN (4)	LAM1 (12)	LAM3 (10)

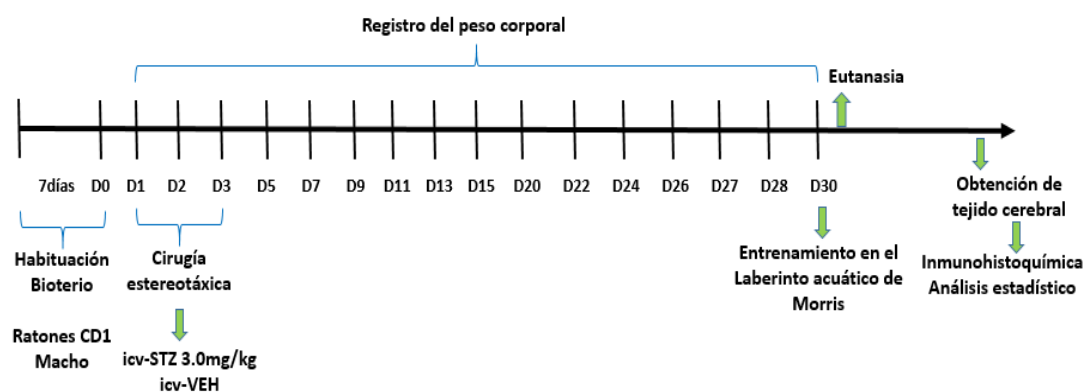


Figura 13. Representación global de la cronología de la metodología.

### Cirugía estereotáxica

Para producir el modelo esporádico de la EA mediante la administración STZ-icv, en cada animal de los grupos STZ-icv, se realizaron dos cirugías estereotáxicas para administrar 3.0 mg/kg de estreptozotocina (STZ) en los ventrículos laterales. Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital 50 mg/kg vía intraperitoneal. Fueron fijados en el aparato estereotáxico y se les realizó una incisión sagital en el dorso de la cabeza (figura 14), luego realizando la antisepsia de la región, se ubicó Bregma y se ubicaron los ventrículos laterales mediante las siguientes coordenadas, a partir de la línea de Bregma: AP: + 0.3mm, ML:  $\pm$  1.0 mm, DV: -3.0 mm (DeVos & Miller, 2013; Paxinos & Franklin, 2001) y con una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ L, de calibre 26, se les administró STZ (disuelta en LCRa a una dosis de 3 mg/kg) o LCRa para el grupo vehículo (VEH-icv), a una velocidad de 1 $\mu$ L/min. El LCRa también fue administrado con base en el peso corporal del animal. Posteriormente, se realizó antisepsia de la zona y se suturó. Finalmente, los animales fueron vigilados y se colocaron en un calefactor hasta su recuperación. Cuando la recuperación fue completa, se

colocaron en sus respectivas cajas y se regresaron a la sala de bioterio con las condiciones anteriormente mencionadas.

Se realizó el registro del peso corporal de todos los animales en el día uno y tres (para las cirugías) y posteriormente, se realizaron estas mediciones hasta el día 30, recabando un total de nueve datos durante el periodo comprendido desde la cirugía hasta la realización del protocolo del entrenamiento y sobreentrenamiento en el LAM. Los animales permanecieron 7 días antes de iniciar la fase experimental conductual en la habitación del laboratorio, para su habituación. Una vez habituados al vivario del laboratorio y previo a la tarea conductual, los ratones fueron manipulados durante una sesión diaria de 5 minutos, en tres días consecutivos utilizando la técnica de “albóndiga”. La manipulación inició con un acercamiento suave hacia el roedor, se le tomó de la base de la cola y se colocó sobre la mano del experimentador, permitiendo al animal caminar y familiarizarse con el olor y tacto. Posteriormente, se colocó al animal sobre una toalla (encima de la mano del experimentador) y se le cubrió completamente con ella, formando una esfera con las dos manos, donde el ratón se encontraba dentro. Luego, se masajeó al animal en forma circular sin ejercer presión, durante 5 minutos.



Figura 14. Fotografía del roedor fijado en el aparato estereotáxico para realizar la cirugía de administración VEH o STZ-icv. Fuente directa.

### **Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris**

Se evaluó el aprendizaje espacial de los ratones a los 30 días posteriores a la segunda administración de VEH o STZ, en la tarea de LAM. La tarea se realizó en un tanque circular, con diámetro de 100 cm, altura de las paredes de 40 cm y fondo negro, llena de agua opaca (colorada mediante pintura no tóxica), a una temperatura de  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El tanque se dividió

en cuatro cuadrantes imaginarios (figura 15) y, en el centro de uno de ellos, fue situada la plataforma de escape de acrílico negro, de forma cuadrangular, con medidas de 6 x 6 x 15 cm, sumergida a 0.5 centímetros de la superficie del agua para que estuviera oculta. La plataforma se colocó con el objetivo de mecanismo de escape del agua para el roedor. Dicho tanque, se colocó en una habitación cerrada en el laboratorio, iluminada con luz blanca. En las paredes se colocaron cuatro claves extralaberínticas (figura 15), como pistas espaciales para ubicación y posterior localización de la plataforma por parte del animal, las cuales se mantuvieron en el mismo lugar durante todos los ensayos.

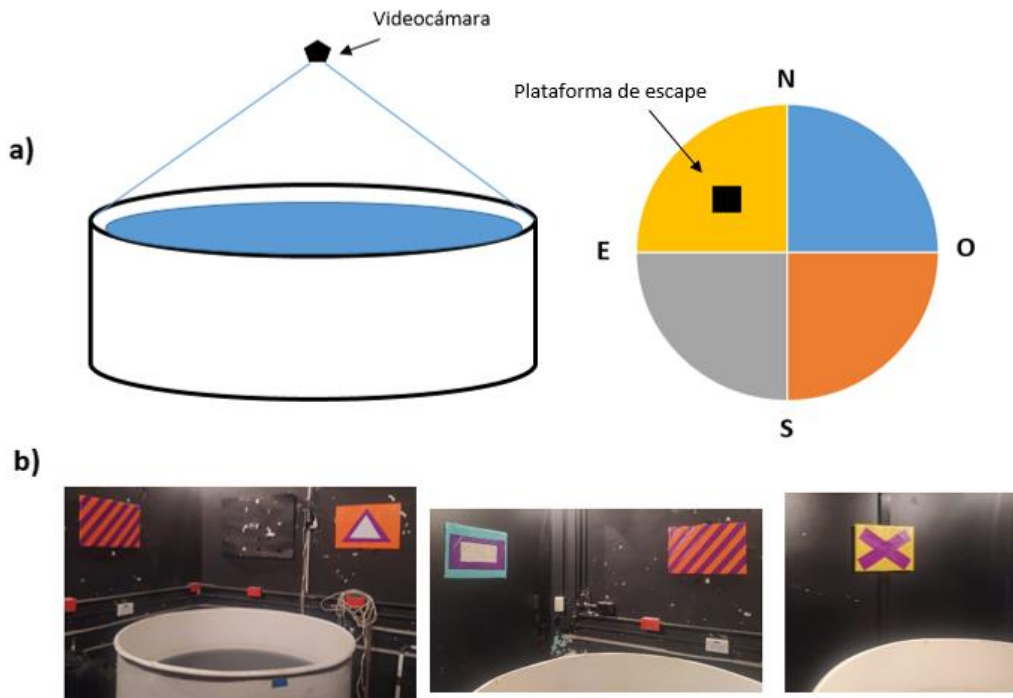


Figura 15. a) Representación del laberinto acuático de Morris (izquierdo), división de cuadrantes imaginarios, posicionamiento de la plataforma y representación de los puntos cardinales de los cuales fueron liberados los animales en cada ensayo: N:norte; S:sur; E:este; O:oeste (derecha); b) Fotografías de claves extralaberínticas.

Veinticuatro horas después de la última manipulación, se inició con el entrenamiento en el LAM, el cual consistió en ocho ensayos diarios por un día de entrenamiento o tres días consecutivos (sobrentrenamiento cognitivo), dependiendo de la condición del grupo experimental. Cada ensayo consistió en introducir al animal en el tanque desde uno de los cuatro diferentes puntos de liberación alrededor del tanque (norte, sur, este y oeste), los cuales fueron constantes para todos los animales en cada ensayo (figura 15), sin embargo, el orden de liberación fue diferente en cada día. En el primer día de entrenamiento y antes



de iniciar los ensayos, se colocó al animal en la plataforma de escape una sola vez durante 20 s, con el fin de que la conociera. Posteriormente, se dio inicio a los ensayos, los cuales consistieron en introducir al animal con el hocico apuntando hacia las paredes del tanque (en el punto de liberación correspondiente a cada ensayo) y dejarlo durante 60 s para que buscara la plataforma, en caso de no encontrarla, se retira al animal, se seca con una toalla y se le deja descansar durante 30 segundos antes de iniciar el siguiente ensayo y, en caso de si encontrarla, se le permite permanecer 20 s en ella antes de ser retirado, secado y dejarlo descansar. Únicamente en el primer ensayo del primer día, si el roedor no consiguió localizar la plataforma, se le guía hasta ella para que permanezca ahí durante 20 s, antes de retirarlo y dejarlo descansar, esto no se realizó en ningún otro ensayo.

Durante cada ensayo se midió la latencia de escape (tiempo que tarda el animal en encontrar la plataforma), medido manualmente con cronómetro y, mediante una videocámara colocada en la parte superior, al centro del tanque (figura 15), se capturaron los videos de los animales.

### **Eutanasia y obtención de muestras**

Una vez terminado el experimento conductual, en el último día de entrenamiento, una hora posterior al primer ensayo, se realizó la eutanasia de los animales por decapitación. Primero, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico 100 mg/kg vía intraperitoneal, posteriormente, se realizó un corte limpio a nivel cervical. A continuación, el cerebro fue extraído rápidamente (< 3 min) con equipo de micro disección y, por medio de la técnica de congelación en fresco fue sumergido en 2-metil butano rodeado de hielo seco y etanol al 90% durante 2 min, inmediatamente, las muestras extraídas se llevaron a congelación y se mantuvieron ahí a una temperatura de -80°C para su posterior análisis.

### **Manejo de los tejidos y obtención de los cortes**

En cada uno de los cerebros, se realizó un corte a nivel de cerebelo y a partir de ahí se realizó otro corte a 4 mm hacia la zona anterior aproximadamente a nivel del estriado, para obtener el hipocampo dorsal en su totalidad. En criomoldes de plástico rectangular se organizaron tres bloques de diez cerebros cada uno y un bloque extra con dos cerebros, para el montaje y posterior corte de las muestras, se cubrieron en su totalidad dentro del criomolde con Tissue Tek y se mantuvo a -20°C en todo momento. En cada bloque se colocaron cerebros de todas las condiciones experimentales de manera aleatoria y en diferente posición por bloque, de tal manera que se realizaron cortes con una n= 4-5 para cada grupo (8 grupos en total) y se les asignó una letra (de la A a la J). Posteriormente, para obtener los cortes coronales de 20 µm, se utilizó el criostato (Leica) a una temperatura de entre -19 °C a -21°C. Las laminillas permanecieron a temperatura ambiente por 24 horas y

posteriormente, se congelaron y mantuvieron a -20°C por 6 días antes de ser utilizadas para la inmunohistoquímica.

### **Inmunohistoquímica de fluorescencia**

Durante el primer día de la inmunohistoquímica se seleccionaron las laminillas que incluyeran cortes seriados, equivalentes y equidistantes del hipocampo dorsal, para ello se siguieron las siguientes coordenadas: a partir de Bregma, de -1.58 mm a -2.18 mm en sentido antero-posterior. Se fijaron con paraformaldehído al 2% con pH de 7.4 por 10 min. Posteriormente, se realizaron lavados con solución salina de fosfato-tween (PBS-T por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline-tween) y lavados con solución salina de fosfato (PBS por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline) por 5 min. Se continuó con el quenching de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 min, seguido de lavados de PBS-T y lavados de PBS (5 min cada uno). Se realizó el bloqueo con TSA y 1 µL de tritón por 30 min. Después, los cortes montados en las laminillas fueron incubados con el anticuerpo primario anti-GFAP (1:500) a 4°C durante toda la noche.

En el segundo día se inició con lavados de PBS-T y lavados de PBS (5 min cada uno). Se continuó con la incubación del anticuerpo secundario anti-mouse-biotinilado (1:500) por 2 h a temperatura ambiente, se realizaron nuevamente los lavados con PBS-T y los lavados con PBS por 5 min cada uno. Se continuó con la incubación de A + B por 30 min, seguido de los lavados, se colocó el fluoróforo CY3 (1:100) en buffer de amplificación por 30 min. Y, casi para finalizar, se realizaron lavados con PBS-T y PBS y el tejido fue contrateñido con la tinción de DAPI (1:5000) por 30 min para marcar los núcleos celulares. Finalmente, los tejidos fueron cubiertos con el medio de montaje y 24 h después sellados con esmalte transparente para uñas. Las muestras fueron almacenadas en la oscuridad a 4°C hasta su uso. Previamente se realizó la estandarización de la técnica de inmunofluorescencia en donde se determinaron las concentraciones de los anticuerpos primario y secundario, el tiempo de fijación y de inactivación de peroxidasas endógenas con el quenching.

### **Adquisición y análisis de imágenes**

Se obtuvieron imágenes en Z-stack por medio del microscopio semiconfocal Apotome AxioImager, utilizando el objetivo de 40x/1.25. Se tomaron dos imágenes de los estratos *radiatum* y *oriens* en cada hemisferio cerebral (figura 16), por lo cual, se obtuvieron 8 fotografías por cada corte (cuatro del hemisferio derecho y cuatro del hemisferio izquierdo). El análisis fue ciego de todas las condiciones experimentales.

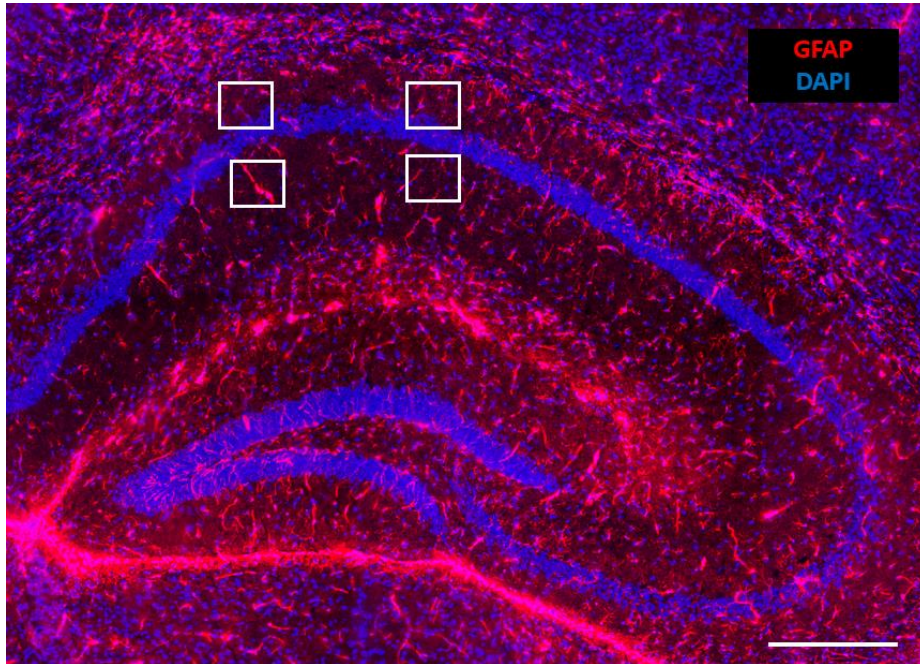


Figura 16. Fotografía de un hipocampo, tomada en el microscopio semiconfocal Apotome AxioImager, en la cual se observa mediante la tinción de fluorescencia: 1) astrocitos, marcados con GFAP (color rojo) y 2) núcleos, marcados con DAPI (color azul). Así mismo se representan las zonas de toma de fotografías en los estratos *radiatum* y *oriens* mediante cuadrados blancos, barra de escala de 500  $\mu\text{m}$ . Fuente directa.

Para el análisis, se exportaron las imágenes obtenidas del microscopio mediante la aplicación de AxioVision y posteriormente, se abrieron en la aplicación ImageJ, en la cual se realizó un aplanado en Z con la mayor intensidad, se completaron las prolongaciones astrocíticas que el programa no logró detectar y finalmente, se esqueletizaron y, mediante el programa, con el uso del plugin skeletonize 2D/3D se realizó la medición de las prolongaciones y la densidad de los astrocitos.

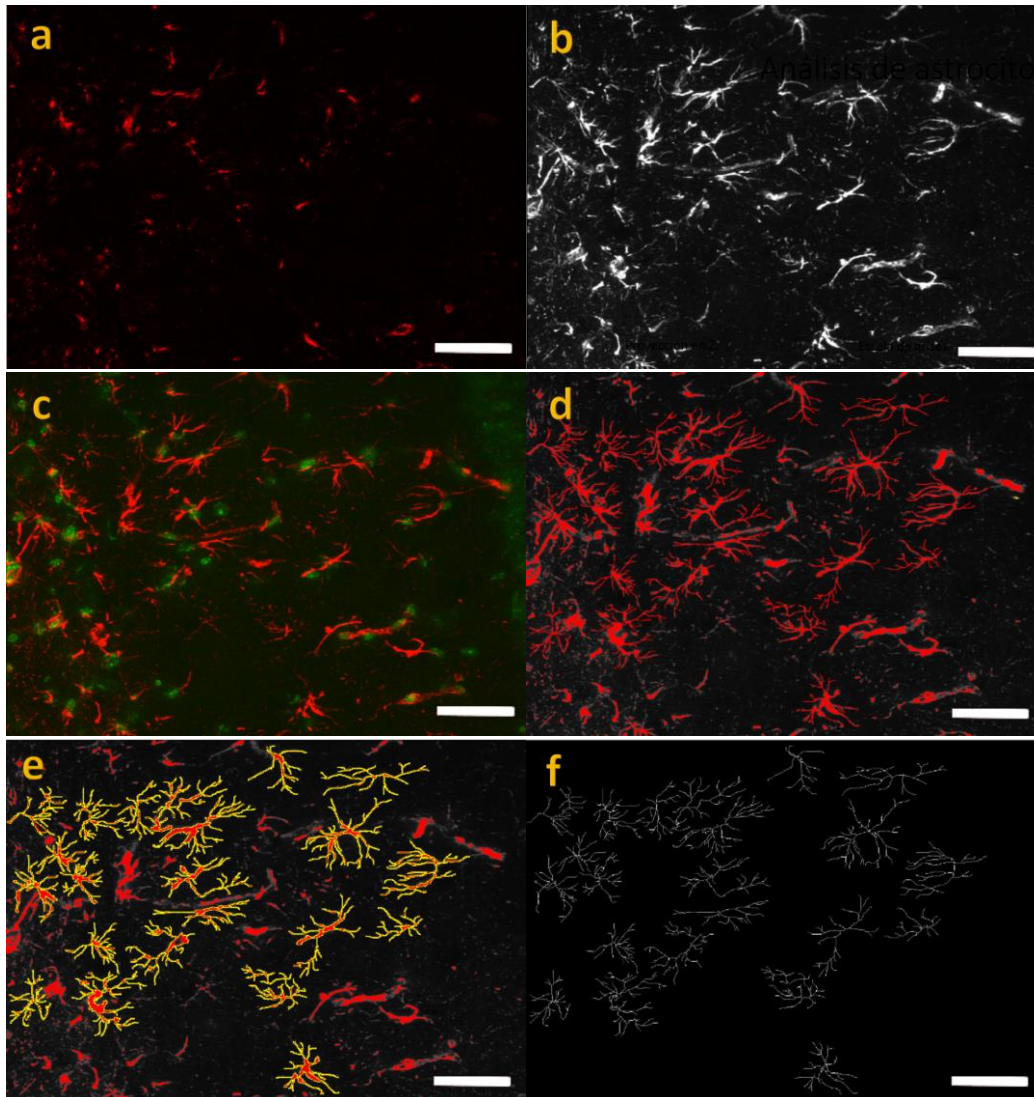


Figura 17. Fotografías representativas del análisis de imágenes: a) Fotografía en uno de los planos en Z; b) Fotografía aplanada de todos los planos útiles, en escala de grises; c) Fotografía aplanada a color (rojo-astrocitos, verde-núcleos); d) Prolongaciones astrocíticas completas; e) Selección de astrocitos; f) Astrocitos binarizados y esqueletonizados. Fuente directa.

### **Análisis estadístico**

Se realizaron ANOVAs de dos vías de medidas repetidas para realizar el análisis del registro del peso corporal. ANOVA de dos y tres vías para el análisis estadístico de la conducta en el LAM. Posteriormente, se realizó la prueba post hoc de Bonferroni/Dunn para determinar las diferencias significativas en pares de grupos cuando la ANOVA fue significativa.

Para el análisis de la histología, se realizó el promedio, tanto de densidad como de número de prolongaciones (datos arrojados por el programa de ImageJ), del total de fotografías (6 para cada estrato), de cada uno de los animales (n=4 por grupo) y posteriormente se

realizaron ANOVA de dos vías para el análisis de estadístico de la morfología y la densidad de astrocitos.

## RESULTADOS

### Registro del peso corporal

El análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas muestra diferencias significativas en el peso corporal, en el factor tiempo ( $F_{(8,8)} = 82.990$ ,  $P = < 0.0001$ ) y en la interacción tiempo x tratamiento ( $F_{(8,360)} = 2.979$ ,  $P = 0.0030$ ), sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el factor tratamiento ( $F_{(1,45)} = 0.126$ ,  $P = 0.7244$ ). La prueba post hoc de Bonferroni muestra una disminución del peso significativo en el día 3 con respecto al día 1 en los grupos VEH ( $P < 0.0001$ ) y STZ ( $P < 0.0001$ ), lo que nos indica que la cirugía produjo este efecto. En el día 11 se muestra un aumento de peso significativo en el grupo VEH con respecto al día 3 ( $P < 0.01$ ), mientras que en STZ el aumento se muestra en el día 8 ( $P < 0.01$ ), lo que se traduce en que hubo una recuperación del peso, alcanzando el peso inicial en ambos grupos en el día 11 ( $P < 0.0001$ ). Por otro lado, se muestra un aumento de peso significativo en VEH en el día 22 con respecto al día 1 ( $P < 0.01$ ), mientras que en STZ se observa en el día 15 ( $P < 0.05$ ), esto nos indica que este efecto se encuentra asociado con el crecimiento de los animales (figura 18).

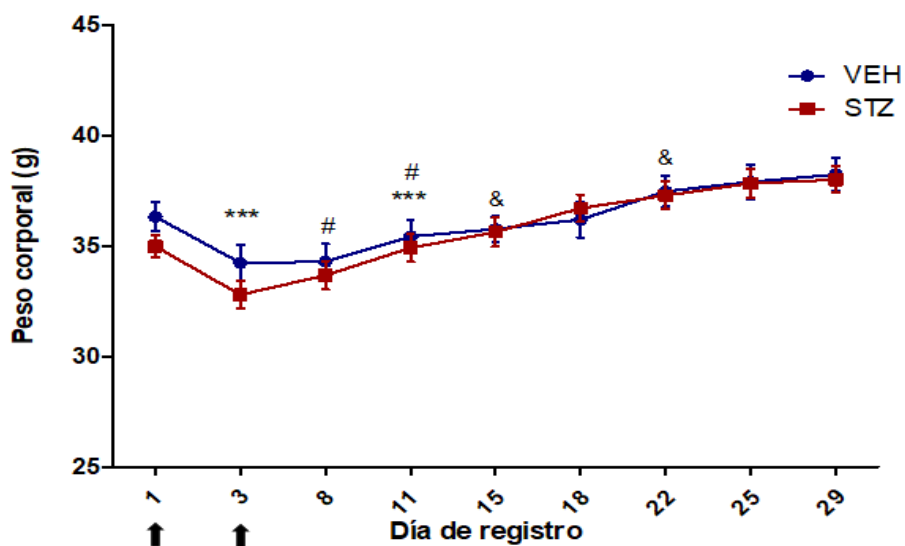


Figura 18. Promedio ( $\pm$  error estándar) del peso corporal de los ratones del grupo vehículo (VEH) y estreptozotocina (STZ) registrado desde el día uno al día 29. \*\*\*  $P < 0.0001$  con respecto al día 1; #  $P < 0.01$  con respecto al día 3; &  $P < 0.05$  con respecto al día 1.  $n = 24$ -30 ratones por grupo. ↑ Indica los días en los que se realizó la intervención quirúrgica para la administración de VEH y STZ.

## **Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre el aprendizaje espacial**

Se realizó un ANOVA de tres vías de medidas repetidas para el análisis del primer día de entrenamiento en el LAM, el cual muestra diferencias significativas en la latencia de escape, en el factor ensayos ( $F_{(1,1)} = 11.115$ ,  $P < 0.0001$ ), sin embargo, en los factores tratamiento y grupo no hubo diferencias significativas ( $F_{(1,1)} = 3.380$ ,  $P = 0.0747$ ;  $F_{(1,1)} = 0.086$ ,  $P = 0.7706$ , respectivamente). Por su parte, las interacciones tratamiento x grupo ( $F_{(1,34)} = 0.791$ ,  $P = 0.3799$ ), ensayos x tratamiento ( $F_{(3,3)} = 2.524$ ,  $P = 0.618$ ), ensayos x grupo ( $F_{(3,3)} = 0.641$ ,  $P = 0.5906$ ) y, ensayos x tratamiento x grupo ( $F_{(3,102)} = 0.485$ ,  $P = 0.6938$ ), no mostraron diferencias significativas. La prueba post hoc de Bonferroni muestra una disminución significativa en la latencia de escape en el ensayo tres con respecto al ensayo uno ( $P < 0.05$ ) y en el ensayo cuatro con respecto al ensayo uno ( $P < 0.01$ ) en los grupos LAM 1 y LAM3 VEH, lo cual indica que hubo un aprendizaje normal en estos animales, sin embargo, en los grupos LAM 1 y LAM 3 STZ no hubo diferencia significativa en la latencia de escape entre los ensayos en el día uno, lo cual nos indica que existe un deterioro en el aprendizaje en estos grupos (figura 19).

Para hacer las comparaciones en el aprendizaje a lo largo de los tres días, se llevó a cabo un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, el cual mostró una diferencia significativa en los factores tratamiento ( $F_{(1,16)} = 4.631$ ,  $P = 0.0470$ ) y ensayos ( $F_{(11,11)} = 7.763$ ,  $P < 0.0001$ ), sin embargo, en la interacción ensayos x tratamiento, no se mostraron diferencias significativas ( $F_{(11,176)} = 1.188$ ,  $P = 0.2982$ ). La prueba post hoc de Bonferroni muestra una disminución significativa en la latencia de escape en el grupo de LAM 3 VEH en los ensayos tres y cuatro del día uno con respecto al ensayo uno del día uno ( $P < 0.01$ ), lo que indica un aprendizaje normal, sin embargo, no hay diferencia significativa en el ensayo uno del día dos con respecto al ensayo uno del día uno, lo que indica que existe un reaprendizaje de la tarea, pero, para el ensayo dos del día dos ya se muestra una diferencia significativa con respecto al ensayo uno del día uno ( $P < 0.05$ ), la cual continúa el resto de los ensayos: ensayo tres, día dos ( $P < 0.0001$ ); ensayo cuatro, día dos ( $P < 0.01$ ); ensayo uno, día tres ( $P < 0.0001$ ); ensayo dos, día tres ( $P < 0.0001$ ); ensayo tres, día tres ( $P < 0.0001$ ); ensayo cuatro, día tres ( $P < 0.0001$ ), todos en relación al ensayo uno del día uno, lo cual indica que este grupo obtuvo un aprendizaje incrementado. Por otra parte, la prueba también nos muestra que en el grupo LAM 3 STZ la disminución significativa en la latencia de escape se dio hasta el ensayo cuatro del día dos ( $P < 0.05$ ), con respecto al ensayo uno del día uno, la cual se mantiene en los cuatro ensayos del día tres ( $P < 0.05$ ), esto nos indica que este grupo tuvo un aprendizaje satisfactorio con el sobreentrenamiento, revirtiéndose el deterioro en el mismo, mostrada en el grupo LAM1 STZ (figura 17).

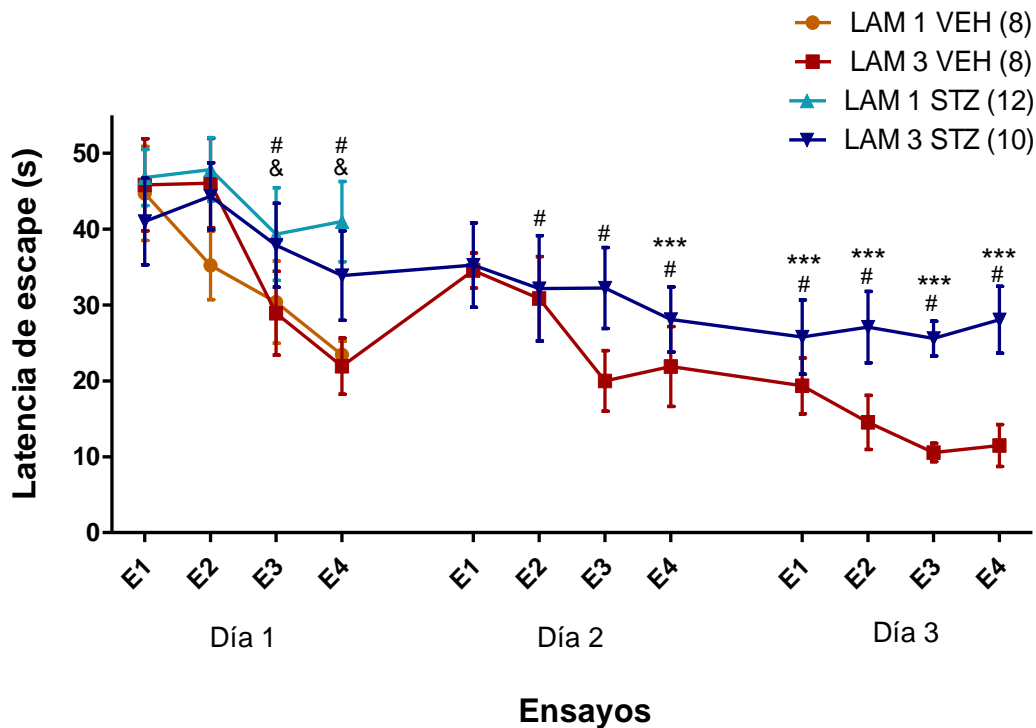


Figura 19. Promedio ( $\pm$  error estándar) de la latencia de escape durante uno o tres días de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, de los ratones del grupo vehículo (VEH) y estreptozotocina (STZ). & diferencia significativa ( $P < 0.05$  a  $P < 0.01$ ) en el grupo LAM1, con respecto al E1 del día uno; # diferencia significativa ( $P < 0.05$  a  $P < 0.0001$ ) en el grupo LAM3 VEH con respecto al E1 del día uno; \*\*\* diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el grupo LAM3 STZ con respecto al E1 del día uno.  $n = 8-12$  ratones por grupo.

### Velocidad de Nado en el LAM

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas no muestra diferencias significativas en la velocidad de nado en el factor tiempo ( $F_{(3,57)} = 1.032$ ,  $P = 0.3853$ ); el factor tratamiento ( $F_{(1,19)} = 0.002797$ ,  $P = 0.9584$ ); ni en la interacción tiempo x tratamiento ( $F_{(3,57)} = 0.08812$ ,  $P = 0.9663$ ) (figura 20), lo cual indica que el tratamiento con STZ no produjo disfunciones en la motricidad de los ratones, mostrándonos con esto que la diferencia significativa en la latencia de escape fue producto únicamente de la alteración cognitiva y por consiguiente, el aprendizaje, producto del sobreentrenamiento cognitivo.

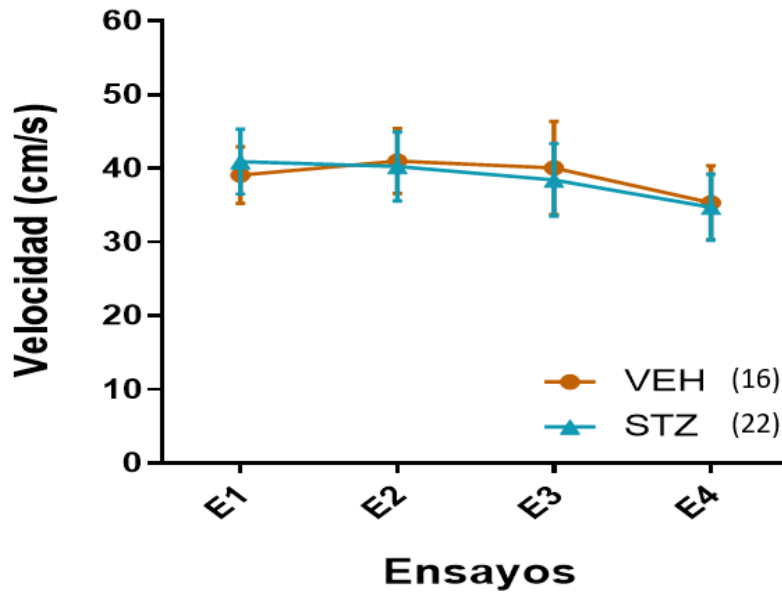


Figura 20. Promedio ( $\pm$  error estándar) de la velocidad de nado de los ratones del grupo vehículo (VEH) y estreptozotocina (STZ). No hay diferencias significativas entre ambos grupos. n= 16-22 ratones por grupo.

### **Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la morfología de astrocitos en el stratum radiatum del CA1 del hipocampo**

Se realizó un ANOVA de dos vías para el análisis de la morfología de astrocitos en el *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo, el cual no muestra diferencias significativas en el factor tratamiento ( $F_{(1,20)} = 0.4298$ ,  $P = 0.5196$ ); grupo ( $F_{(3,20)} = 2.928$ ,  $P = 0.0587$ ); ni en la interacción tratamiento x grupo ( $F_{(3,20)} = 0.4983$ ,  $P = 0.6876$ ), lo cual nos indica que ni el tratamiento con STZ, ni el sobreentrenamiento, generan alteraciones en la morfología de astrocitos en esta región del hipocampo (figura 21).



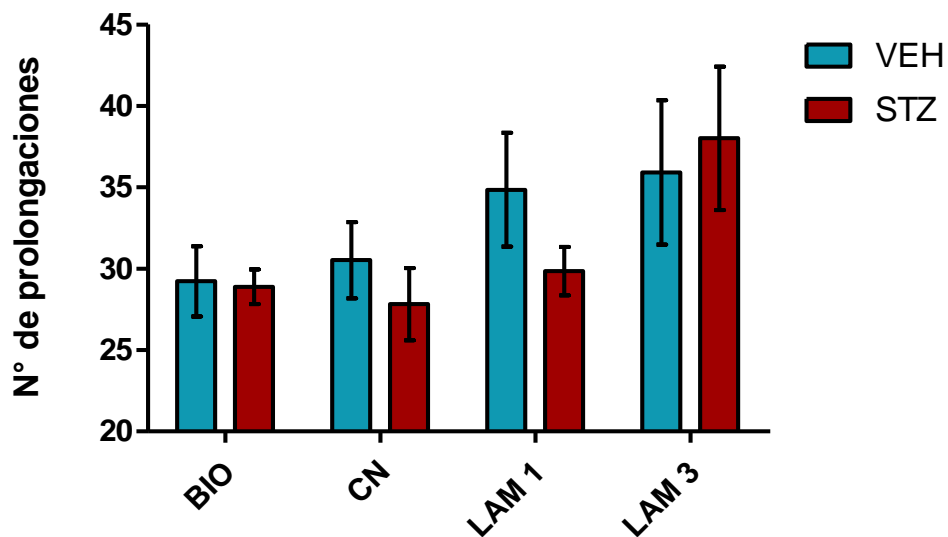


Figura 21. Promedio ( $\pm$  error estándar) de las prolongaciones de astrocitos en el *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo de los ratones con tratamiento con vehículo (VEH) y con estreptozotocina (STZ). No hay diferencias significativas entre tratamientos ni entre grupos.  $n = 3-5$  ratones por grupo.

### Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la densidad de astrocitos en el *stratum radiatum* del CA1 del hipocampo

Se realizó un ANOVA de dos vías para el análisis de la densidad de astrocitos en el *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo, el cual muestra diferencias significativas en el factor tratamiento ( $F_{(1,16)} = 17.52$ ,  $P = 0.0007$ ); grupo ( $F_{(3,16)} = 52.91$ ,  $P < 0.0001$ ); y en la interacción tratamiento x grupo ( $F_{(3,16)} = 21.97$ ,  $P < 0.0001$ ). La prueba post hoc de Bonferroni muestra una disminución en la densidad de los astrocitos entre VEH y STZ en los grupos BIO y LAM1 ( $P = 0.0069$ ;  $P < 0.001$ ); sin embargo, en el grupo control de nado (CN), no se muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P = 0.2175$ ), lo cual indica que la actividad física podría revertir este efecto causado por la STZ, sin embargo, este resultado no es concluyente. Por su parte, en el grupo LAM 3 se muestra una reversión de este efecto, manifestado por una mayor densidad de astrocitos en el *stratum radiatum* del grupo tratado con STZ en comparación con el VEH ( $P = 0.0024$ ), lo cual nos indica que el sobreentrenamiento revirtió el efecto causado por la STZ (figuras 22 y 23).

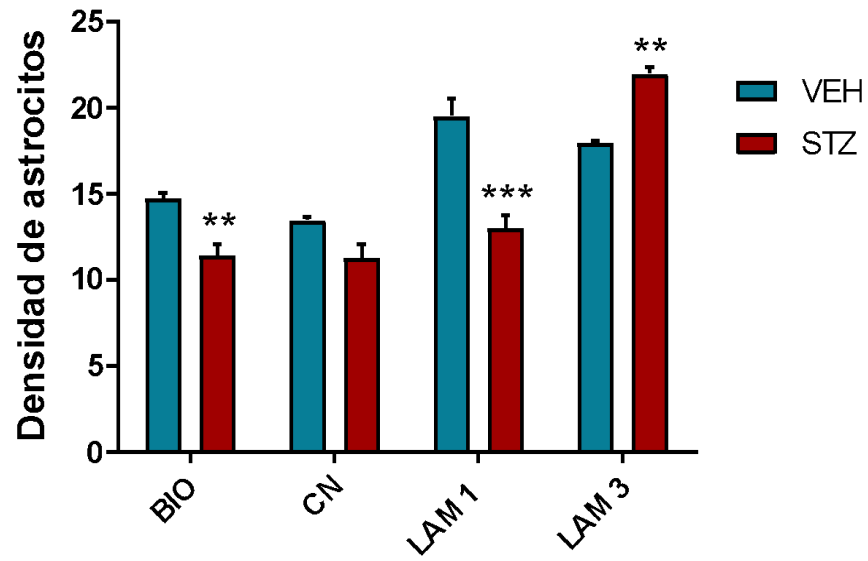


Figura 22. Promedio ( $\pm$  error estándar) de la densidad de astrocitos en el *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo de los ratones con tratamiento con vehículo (VEH) y con estreptozotocina (STZ). \*\*diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos en el grupo bioterio (BIO) y sobreentrenamiento (LAM3); \*\*\* diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) entre tratamientos en el grupo con una sesión en el laberinto acuático de Morris (LAM1); no hay diferencia significativa en el grupo de control de nado (CN).  $n = 3-5$  ratones por grupo.

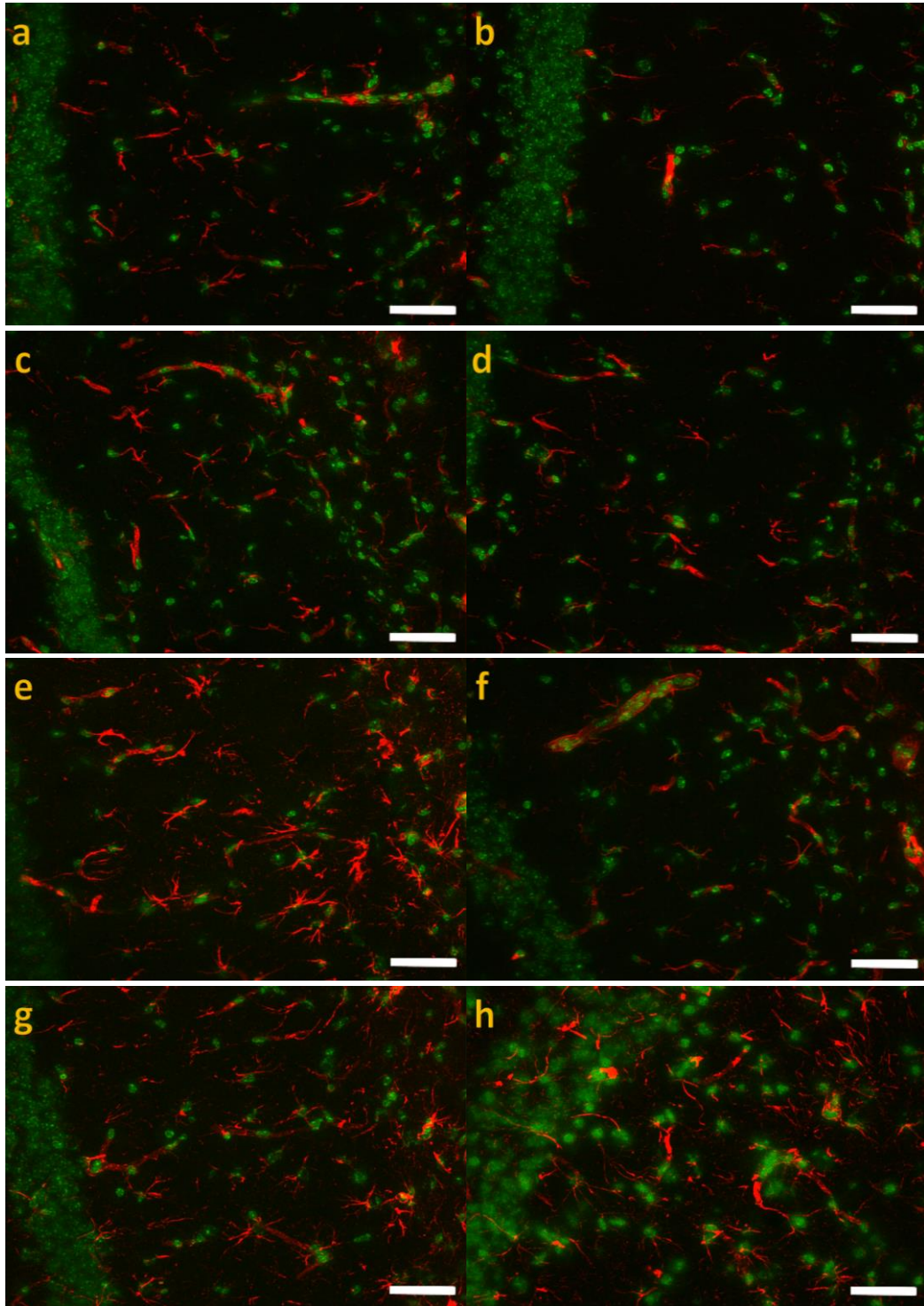


Figura 23. Fotografías representativas del stratum *radiatum* de CA1 del hipocampo en cada uno de los grupos, mediante la técnica de inmunofluorescencia para GFAP (rojo-astrocitos) y DAPI (verde-núcleos): a) BIO VEH; b) BIO STZ; c) CN VEH; d) CN STZ; e) LAM 1 VEH; f) LAM 1 STZ; g) LAM 3 VEH; h) LAM 3 STZ. Fuente directa.

## Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la morfología de astrocitos en el stratum oriens del CA1 del hipocampo

Se realizó un ANOVA de dos vías para el análisis de las prolongaciones de astrocitos en el *stratum oriens* de CA1 del hipocampo, el cual no muestra diferencias significativas en el factor tratamiento ( $F_{(1,19)} = 0.4495$ ,  $P = 0.5107$ ); el factor grupo ( $F_{(3,19)} = 2.030$ ,  $P = 0.1437$ ); ni en la interacción tratamiento x grupo ( $F_{(3,19)} = 3.194$ ,  $P = 0.0470$ ), lo cual nos indica que ni el tratamiento con STZ, ni el sobreentrenamiento, generan alteraciones en la morfología de astrocitos en esta región del hipocampo (figura 24).

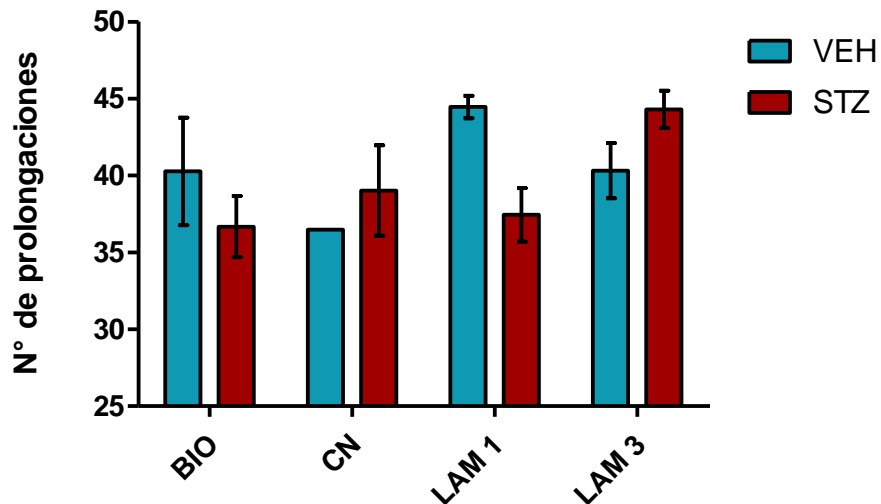


Figura 24. Promedio ( $\pm$  error estándar) de las prolongaciones de los astrocitos en el *stratum oriens* de CA1 del hipocampo de los ratones con tratamiento con vehículo (VEH) y con estreptozotocina (STZ). No hay diferencias significativas entre tratamientos ni entre grupos.  $n = 3-5$  ratones por grupo.

## Efecto de la STZ y del sobreentrenamiento sobre la densidad de astrocitos en el stratum oriens del CA1 del hipocampo

Se realizó un ANOVA de dos vías para el análisis de la densidad de astrocitos en el *stratum oriens* de CA1 del hipocampo, el cual muestra diferencias significativas en el factor tratamiento ( $F_{(1,18)} = 62.61$ ,  $P < 0.0001$ ); el factor grupo ( $F_{(3,18)} = 88.91$ ,  $P < 0.0001$ ); y en la interacción tratamiento x grupo ( $F_{(3,18)} = 29.34$ ,  $P < 0.0001$ ). La prueba post hoc de Bonferroni muestra una disminución significativa en la densidad de astrocitos entre VEH y STZ en los grupos BIO, CN y LAM1 ( $P = 0.0399$ ;  $P = 0.0076$ ;  $P < 0.0001$ ). Por su parte, en el grupo

LAM 3 no hay una diferencia significativa entre tratamientos, lo que indica que los efectos con la STZ son recuperados con el sobreentrenamiento (figuras 25 y 26).

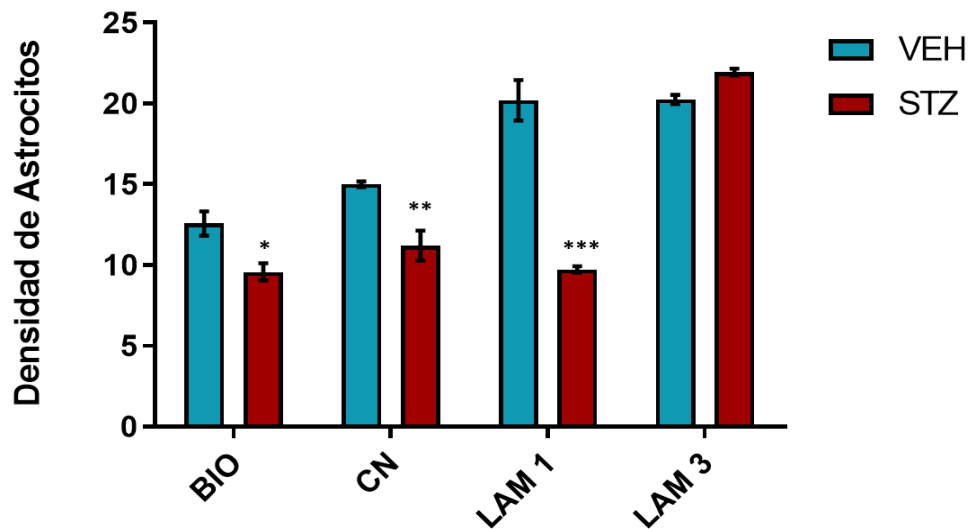


Figura 25. Promedio ( $\pm$  error estándar) de la densidad de astrocitos en el *stratum oriens* de CA1 del hipocampo de los ratones con tratamiento con vehículo (VEH) y con estreptozotocina (STZ). \*diferencia significativa ( $P = 0.0399$ ) entre tratamientos del grupo bioterio (BIO); \*\* diferencia significativa ( $P = 0.0076$ ) entre tratamientos del grupo control de nado (CN); \*\*\* diferencia significativa entre tratamientos del grupo con una sesión en el laberinto acuático de Morris (LAM1) ( $P < 0.0001$ ); no hay diferencia significativa en el grupo de sobreentrenamiento (LAM3).  $n = 3-5$  ratones por grupo.

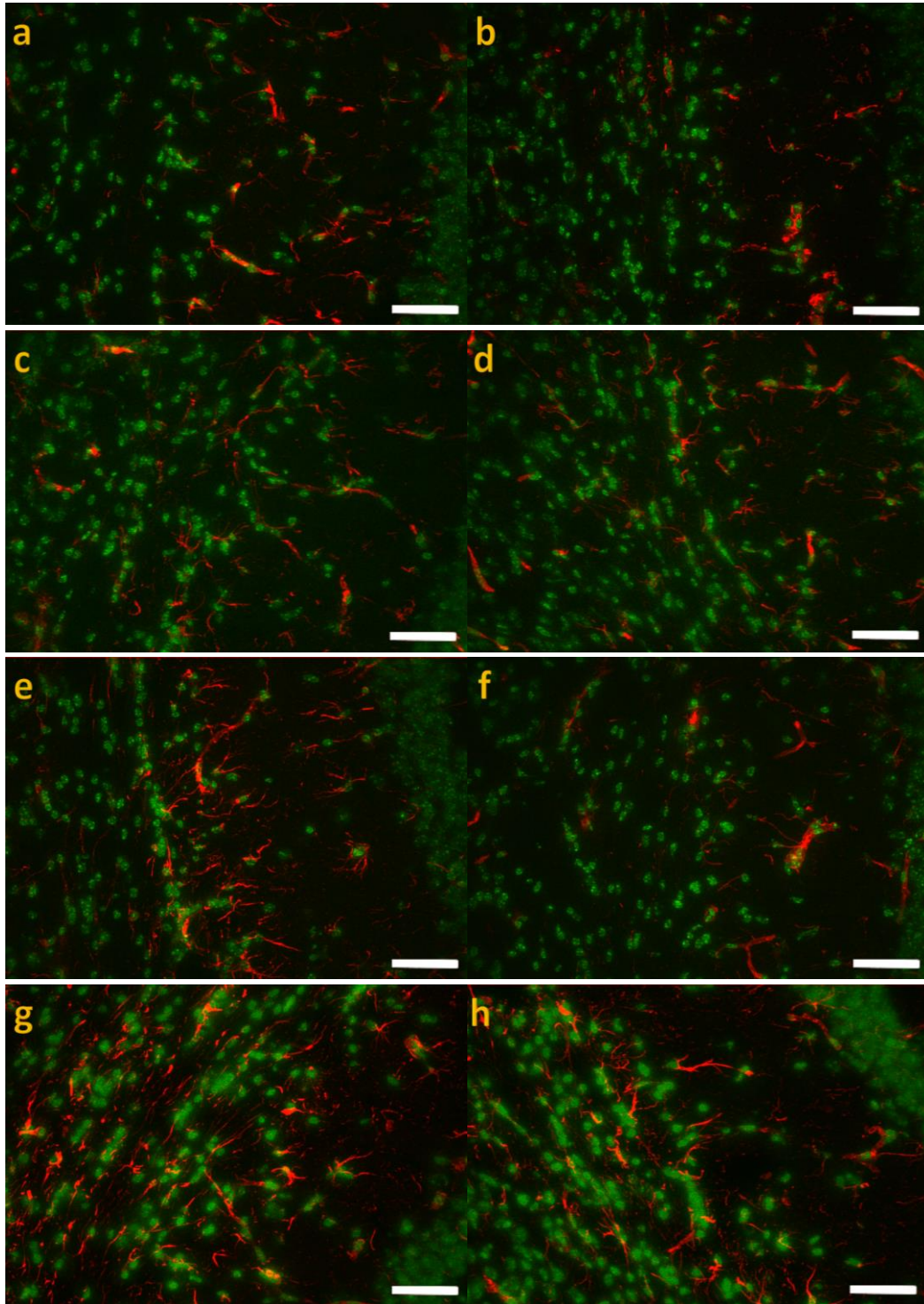


Figura 26. Fotografías representativas del *stratum oriens* de CA1 del hipocampo en cada uno de los grupos, mediante la técnica de inmunofluorescencia con GFAP (rojo-astrocitos) y DAPI (verde-núcleos): a) BIO VEH; b) BIO STZ; c) CN VEH; d) CN STZ; e) LAM 1 VEH; f) LAM 1 STZ; g) LAM 3 VEH; h) LAM 3 STZ.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que tanto la administración de STZ-icv en ratones CD1 machos, para reproducir el modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica, como, la estrategia de sobreentrenamiento cognitivo, generan cambios a nivel conductual e histológico. De manera general y en orden cronológico, encontramos que: I) Existe un deterioro en el aprendizaje espacial en los animales con STZ-icv, pero no así en los VEH-icv; II) El sobreentrenamiento cognitivo genera un aprendizaje incrementado en los animales VEH-icv; III) El sobreentrenamiento cognitivo genera un aprendizaje normal en los animales STZ-icv, revirtiendo el efecto de deterioro provocado previamente por el fármaco; IV) La administración STZ-icv no genera alteraciones en la motricidad de los animales; V) A nivel histológico, existe una disminución en la densidad de los astrocitos hipocampales de los estratos *radiatum* y *oriens* en los animales STZ-icv, sin embargo, la morfología permanece sin alteraciones significativas en estas regiones; VI) El sobreentrenamiento provoca un aumento en la densidad de astrocitos hipocampales de los estratos *radiatum* y *oriens* en los animales STZ-icv, revirtiendo el efecto causado por la administración del fármaco.

En este trabajo se demostró que la administración STZ-icv provoca un deterioro en el aprendizaje espacial de los roedores, evaluado en el LAM. Estos resultados son acordes con la hipótesis planteada en esta tesis, además es sustentada por otros autores, tales como, Hoyer et al., (1994); Rodrigues et al., (2010); Rai et al., (2014); Wu et al., (2018), los cuales señalan que la administración icv de STZ a una dosis de 3 mg/kg genera déficits cognitivos, manifestados en el aprendizaje y la memoria espacial. Estas observaciones indican que la administración de este fármaco es capaz de ocasionar alteraciones hipocampales que se reflejan mediante alteraciones en el aprendizaje espacial de los roedores STZ-icv, en comparación con los roedores VEH-icv, los cuales presentan una curva de aprendizaje normal. Esto podría estar explicado por la degradación sináptica (regulación a la baja de proteínas sinápticas sinaptofisina y espinofilina) provocada por el modelo, según lo descrito por Wu et. al (2018), por una alteración en los mecanismos de plasticidad (cambios estructurales y/o funcionales en la neurona) que a su vez generan alteraciones en los circuitos y ensamblajes neuronales encargados del establecimiento de patrones a corto y largo plazo, necesarios para el aprendizaje y la formación de la memoria (Ramírez-Amaya et al., 1999), o en el caso de este trabajo, por alteraciones en los astrocitos, que discutiremos más adelante.

Por otra parte, demostramos que el modelo STZ-icv genera alteraciones a nivel histológico, manifestado por una disminución en la densidad de astrocitos hipocampales de los estratos *radiatum* y *oriens* del CA1 en los animales tratados con este fármaco. Este hallazgo es congruente con los diversos estudios realizados previamente, tales como, el de Bassani

(2018) y el de Zappa-Villar (2018), en los cuales se observó una disminución en el total de células positivas para GFAP en el giro dentado y en los estratos *radiatum* y *lacunosum* de CA1 del hipocampo dorsal, posterior a la administración STZ-icv; o el trabajo de Rodrigues et al., (2010), en el cual se describió una disminución significativa de la intensidad de la señal del anticuerpo GFAP utilizado para la detección de los astrocitos en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo, evaluado mediante densidad óptica. Sin embargo, estos hallazgos son contrarios a los encontrados por Kumar et al., (2018), en el cual demostraron un aumento significativo en la densidad de GFAP en la zona subventricular e hipocampo, 18 días posteriores a la administración de 6 mg/kg de STZ-icv, esto podría deberse a la diferencia de dosificación del fármaco y el tiempo transcurrido después de la administración de la STZ y la medición de GFAP. Por otra parte, también existe discrepancia con los resultados presentados por Chen et al., (2012) en los cuales manifiesta, mediante una prueba de Western blot, que 21 días posteriores a la administración de 3 mg/kg de STZ-icv en ratones hembra de 6 meses de edad, hay niveles aumentados de marcaje de GFAP en todo el cerebro, con predominio de zona periventricular e hipocampo.

Además, en nuestro estudio, encontramos que si bien, el modelo STZ-icv genera una disminución en la densidad de astrocitos, no genera alteraciones en el número de prolongaciones, este dato se relaciona y se complementa con lo reportado por Zappa-Villar et al., (2018) en su estudio, en el cual analiza la longitud de las prolongaciones astrocíticas y el número de sus intersecciones y reporta una reducción en la longitud de los procesos astrocíticos en los estratos *radiatum* y *lacunosum*, así como una caída importante en la complejidad de las ramificaciones del estrato *radiatum* pero no del estrato *lacunosum* y pérdida completa de ramificaciones en CA1 y CA3 del hipocampo, posterior a la administración de 3 mg/kg de STZ-icv en ratas macho. Esto podría deberse a los tiempos transcurridos entre la administración del fármaco y el análisis histológico, a la diferencia de especies, el tamaño de nuestra muestra, o la diferencia en el método de análisis de los astrocitos.

Los resultados en la histología se pueden correlacionar con los hallazgos encontrados en la conducta por: I) Se ha demostrado que los métodos que involucran habilidades motrices (ejercicio) y cognitivas (aprendizaje) en conjunto, como es el caso del laberinto acuático de Morris, resultan en un aumento en la densidad y ramificaciones astrocíticas (Jahanshahi et al., 2008), esto se ve reflejado en nuestros grupos LAM 1 VEH en los cuales existe un aumento en la densidad de astrocitos en comparación con los grupos STZ; II) Santello et al., (2019) y Jahanshahi et al., (2008) en sus estudios relacionan la densidad de astrocitos y su grado de participación en el aprendizaje y memoria espaciales, esto debido a que un aumento en la densidad de astrocitos, se relaciona con un aumento de sinapsis y esto a su vez es importante para el procesamiento cognitivo ya que se requiere una actividad



coordinada de conjuntos sinápticos y astrocitos y una adecuada señalización de astrocitos a niveles sinápticos para lograr un adecuado desempeño cognitivo en los animales; III) Mediante vías intracelulares, los astrocitos modulan selectivamente la actividad de neuronas vecinas, produciendo potenciación a largo plazo en el hipocampo, por medio de la producción de L-lactato y noradrenalina y con ello favoreciendo el aprendizaje y la formación y consolidación de la memoria (Kol et al., 2020). Por lo tanto, al generar una disminución en la densidad de astrocitos, efecto del modelo STZ-icv, es congruente que existan alteraciones tanto en la plasticidad, como en las sinapsis tripartitas y por lo tanto, alteraciones en los procesos cognitivos, como el aprendizaje.

A su vez, este estudio demostró que el sobreentrenamiento cognitivo genera un aprendizaje incrementado en los grupos VEH, lo cual es congruente con lo mencionado en el trabajo de Kealy (2008), en el cual establece que la exposición repetida, también llamada sobreexposición o sobreentrenamiento, a una misma tarea conductual, puede repercutir estructural y/o funcionalmente en la estructura encargada de dicha tarea, generando un aprendizaje facilitado. Y por su parte, el sobreentrenamiento generó un aprendizaje normal en los grupos STZ, mejorando el rendimiento de estos roedores, revirtiendo así la alteración en el aprendizaje (efecto causado por la administración del fármaco) y acercándose a parámetros de roedores VEH. Este resultado se relaciona con el trabajo de Morris et al., (1990), en el cual los roedores con lesiones hipocampales y subiculares, mejoran su rendimiento en la tarea cognitiva (LAM), generando búsquedas bastante acertadas en la prueba, disminución de la latencia de escape, mayor permanencia en el cuadrante objetivo y alcanzan parámetros cercanos a lo normal, posterior a una intervención con sobreentrenamiento, resultados acordes con los obtenidos en este trabajo. Así mismo, estos resultados concuerdan con otros autores, en los que nos basamos para este estudio, tal es el caso de Ramírez et al., (1999;2001), Gómez et al., (2020) y Mishra et al., (2018), los cuales reportaron resultados similares en sus estudios (disminución en la latencia de escape, mayor permanencia en el cuadrante objetivo, mayor número de cruces al cuadrante objetivo), generando un aprendizaje normal, posterior a una estrategia de sobreentrenamiento en roedores con lesiones hipocampales.

Por otro lado, nuestros resultados coinciden con diversos tipos de evidencia que apuntan a que, posterior al sobreentrenamiento de una tarea de aprendizaje espacial, pueden ocurrir variaciones en los mecanismos plásticos, tales como: cambios en la estructura, distribución y número de sinapsis de fibras musgosas en los estratos *lucidum* y *oriens* del hipocampo (Ramírez-Amaya et al., 1999); aumento significativo en la densidad de excrescencias espinosas en las dendritas basales de neuronas piramidales en CA3 del hipocampo (Gómez-Padilla et al., 2020); aumento sustancial de la proyección de fibras musgosas al *stratum oriens* en CA3 del hipocampo (Ramírez-Amaya et al., 2001); aumento en el

marcaje de células gliales en la zona subventricular e hipocampo (Mishra et al., 2018). Todos estos resultados concuerdan con los cambios estructurales encontrados en este trabajo, manifestados mediante el aumento en la densidad de astrocitos en los grupos STZ intervenidos con sobreentrenamiento.

El aumento en la densidad de astrocitos, posterior al sobreentrenamiento, se correlaciona con los resultados obtenidos en la tarea conductual, debido a que un mayor número de estas células se traduce en una mayor comunicación astrocito-sinápsis, la cual está presente en diversos circuitos del SNC y por la cual repercute en las funciones sinápticas y en la remodelación plástica de circuitos sinápticos necesarios para el aprendizaje, la codificación de la memoria y otras funciones cognitivas, por lo tanto, al tener un mayor número de astrocitos en los roedores VEH, se logra una mejora en la actividad coordinada de conjunto de neuronas y circuitos sinápticos y por lo tanto, en estos grupos sin lesión, el aprendizaje que presentan de manera normal, se ve incrementado; y de manera similar, en los grupos STZ esta actividad también se ve favorecida, modificando la alteración en el aprendizaje, efecto del fármaco, logrando un aprendizaje normal, con valores cercanos a los de los roedores sin lesión hipocampal.

Por lo tanto, el sobreentrenamiento puede ser una estrategia útil para aminorar el efecto negativo sobre el hipocampo, producido por la administración de STZ-icv, debido a los cambios plásticos que genera sobre el SNC, los cuales a su vez, repercuten funcionalmente en la capacidad de aprendizaje espacial y formación y consolidación de la memoria espacial, acercándose a valores normales. Sin embargo, se sugiere continuar con investigación que refuerce los resultados obtenidos en este estudio.

## CONCLUSIONES

- De acuerdo con el presente estudio, el modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica, inducido por STZ-icv, presenta alteraciones en el aprendizaje espacial, así como, alteraciones histológicas, manifestadas por una disminución en la densidad de astrocitos en los estratos *radiatum* y *oriens* de CA1 del hipocampo dorsal. Los datos expuestos en el presente trabajo sugieren que esta disminución de astrocitos está relacionada con la alteración en el aprendizaje espacial.
- En cuanto al sobreentrenamiento cognitivo en la tarea del LAM, se demostró que, al ser utilizado como estrategia en un animal sano, éste manifiesta un aprendizaje incrementado o facilitado con respecto al aprendizaje normal que genera una sola sesión de la misma tarea; y al ser aplicado en el modelo animal con EA esporádica, las alteraciones en el aprendizaje (efecto de la administración del fármaco) se ven revertidas, alcanzando un aprendizaje espacial normal. Además, esta intervención en ambos casos (modelo sano y modelo EA esporádica), demostraron un aumento en la densidad de astrocitos en los estratos *radiatum* y *oriens* de CA1 del hipocampo dorsal, el cual, de acuerdo a nuestro estudio, está directamente relacionado con la mejora en el aprendizaje.
- Se concluye que esta estrategia de sobreentrenamiento cognitivo, en una tarea que involucre tanto la actividad física, como cognitiva, como es el LAM, puede resultar una herramienta útil en la intervención de la EA esporádica. Sería interesante realizar algún protocolo que involucre ambos tipos de actividad, en pacientes con EA y observar cuál es el efecto sobre las habilidades cognitivas (como el aprendizaje) en ellos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Goshen, I. (2018). Astrocytic activation generates de novo neuronal potentiation and memory enhancement. *Cell*, 174(1), 59-71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Adel K. Afifi, R. A. B. (2006). *Neuroanatomía funcional* (Segunda ed; M.-H. Interamericana, ed.).
- Álvarez-cisneros, T., Torres-castro, S., Mena-montes, B., Magdalena, N., Montes, B. M., Castro, S. T.,... Alice, P. S. (2017). *Género y salud en cifras*.
- Álvarez-Tostado, José L., R. S. G. (2012). El astrocito: una estrella tras bambalinas. *Ciencia*, 68–74.
- Armstrong, R. A. (2013). What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica*, 51(3), 169–188. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.37702>
- Baglietto-Vargas, D., Shi, J., Yaeger, D. M., Ager, R., & LaFerla, F. M. (2016). Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 64, 272–287. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.005>
- Barkhof, F., Fox, N. C., Bastos-Leite, A. J., & Scheltens, P. (2011). Neuroimaging in dementia. *Neuroimaging in Dementia*, 1–278. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00818-4>
- Bashiri, H., Enayati, M., Bashiri, A., & Salari, A. A. (2020). Swimming exercise improves cognitive and behavioral disorders in male NMRI mice with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiology and Behavior*, 223(March), 113003. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113003>
- Bassani, T. B., Bonato, J. M., Machado, M. M. F., Cópola-Segovia, V., Moura, E. L. R., Zanata, S. M., ... Vital, M. A. B. F. (2018). Decrease in adult neurogenesis and neuroinflammation are involved in spatial memory impairment in the streptozotocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in rats. *Molecular Neurobiology*, 55(5). <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0645-9>
- Bello-Medina, P. C., González-Franco, D. A., & Medina Andrea, C. (2018). El hipocampo: historia, estructura y función. *TEPEXI Boletín Científico de La Escuela Superior Tepeji Del Río*, 5(10). <https://doi.org/10.29057/estr.v5i10.3303>
- Benavides, F., & Guénet, J. (2003). Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios Básicos y Aplicaciones*, (1984), 105–136. Retrieved from [http://www.transtechsociety.org/benavides\\_guenet\\_2003.php](http://www.transtechsociety.org/benavides_guenet_2003.php)

- Celis-De la Rosa, A. de J., Cabrera-Pivaral, C. E., Báez-Báez, M. G. L., Celis-Orozco, A., Gabriel-Ortiz, G., & Zavala-González, M. A. (2018). Mortalidad por enfermedad de Alzheimer en México de 1980 a 2014. *Gaceta Medica de Mexico*, *154*(5), 550–554.  
<https://doi.org/10.24875/GMM.18003361>
- Chen, Y., Liang, Z., Blanchard, J., Dai, C. L., Sun, S., Lee, M. H., Gong, C. X. (2013). A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Molecular Neurobiology*, *47*(2), 711–725. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8375-5>
- Chen, Y., Tian, Z., Liang, Z., Sun, S., Dai, C. ling, Lee, M. H., Gong, C. X. (2012). Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, *7*(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051432>
- D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, *36*(1), 60–90. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00067-4)
- DeVos, S. L., & Miller, T. M. (2013). Direct intraventricular delivery of drugs to the rodent central nervous system. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (75), 1–10.  
<https://doi.org/10.3791/50326>
- Eleanor Drummond, T. W. (2017). Alzheimer's disease: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol.*, *133*(2), 155–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>.Alzheimer
- Eng, L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, *8*(C), 203–214.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(85\)80063-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(85)80063-1)
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein : GFAP-thirty-one years (1969 – 2000 )\*. *Neurochemical Research*, *25*, 1439–1451.
- Engelhardt, E. (2012). Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica pathophysiological features of sporadic Alzheimer's disease. *Rev Bras Neurol*, *48*(4), 21–29.  
 Retrieved from <http://files.bvs.br/upload/S/0101-8469/2012/v48n4/a3349.pdf>
- Fakhoury, M. (2017). Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Current Neuropharmacology*, *15*, 508–518.  
<https://doi.org/10.2174/1570159x15666170720095240>
- Fernández, A. C. (2015). *Modulación sináptica a corto y largo plazo mediada por astrocitos en hipocampo.*

- Frost, G. R., & Li, Y. M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biology*, 7(12), 1–14. <https://doi.org/10.1098/rsob.170228>
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70(1), 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- Garre-Olmo, J. (2018). Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Revista de Neurología*, 66(11), 377–386. <https://doi.org/10.33588/rn.6611.2017519>
- Garwood, C. J., Ratcliffe, L. E., Simpson, J. E., Heath, P. R., Ince, P. G., & Wharton, S. B. (2017). Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 43(4), 281–298. <https://doi.org/10.1111/nan.12338>
- Gómez-Padilla, E., Bello-Medina, P. C., León-Jacinto, U., Orta-Salazar, E., Quirarte, G. L., Ramírez-Amaya, V., Díaz-Cintra, S. (2020). Morris water maze overtraining increases the density of thorny excrescences in the basal dendrites of CA3 pyramidal neurons. *Behavioural Brain Research*, 379. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112373>
- Grieb, P. (2016). Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1741–1752. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes en las enfermedades neurodegenerativas (I): Función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
- Hammond, C. (2015). The adult hippocampal network. In *Cellular and Molecular Neurophysiology: Fourth Edition* (Fourth Edn). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397032-9.00019-4>
- Hoyer, S., Muller, D., & Plaschke, K. (1994). Desensitization of brain insulin receptor. Effect on glucose/energy and related metabolism. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, (44), 259–268. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9350-1\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9350-1_20)
- Jahanshahi, M., Sadeghi, Y., Hosseini, A., Naghdi, N., & Marjani, A. (2008). The effect of spatial learning on the number of astrocytes in the CA3 subfield of the rat hippocampus. *Singapore Medical Journal*, 49(5), 388–391.
- Katzman, R. (2018). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 559(7715), 964–973.
- Kealy, J., Diviney, M., Kehoe, E., McGonagle, V., O'Shea, A., Harvey, D., & Commins, S. (2008). The effects of overtraining in the Morris water maze on allocentric and egocentric learning strategies in rats. *Behavioural Brain Research*, 192(2), 259–263.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.04.009>

- Kimelberg, H. K., & Norenberg, M. D. (1989). *Astrocytes*. 260(4), 66–77.
- Knezovic, A., Osmanovic-Barilar, J., Curlin, M., Hof, P. R., Simic, G., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2015). Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 122(4), 577–592. <https://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Kol, A., Adamsky, A., Groysman, M., Kreisel, T., London, M., & Goshen, I. (2020). Astrocytes contribute to remote memory formation by modulating hippocampal–cortical communication during learning. *Nature Neuroscience*, 23(10), 1229–1239. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0679-6>
- Li, D., Huang, Y., Cheng, B., Su, J., Zhou, W. X., & Zhang, Y. X. (2016). Streptozotocin induces mild cognitive impairment at appropriate doses in mice as determined by long-term potentiation and the Morris water maze. *Journal of Alzheimer's disease*, 54(1), 89–98. <https://doi.org/10.3233/JAD-150979>
- Lu, Y., Dong, Y., Tucker, D., Wang, R., Ahmed, M. E., Brann, D., & Zhang, Q. (2017). Treadmill exercise exerts neuroprotection and regulates microglial polarization and oxidative stress in streptozotocin- induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 56(4), 1469–1484. <https://doi.org/10.3233/JAD-160869>.Treadmill
- Ma Elisa Alonso Vilatela Dra Ana Luisa Sosa Ortiz Dra Zoila Trujillo De los Santos, D. (1996). *Visión actual de las demencias*. 21. Retrieved from <http://www.archivosdeneurociencias.com/>
- Mantzavinos, V., & Alexiou, A. (2017). Biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis. *Current Alzheimer Research*, 14(11), 1149–1154. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203125942>
- Martínez Castillo, M. A. (1997). Altamirano Bautista, Adriana. Manual para manejo de animales de laboratorio. México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, 1994, 98 p. *Tópicos de Investigación y Posgrado*, 5(2), 123–123. Retrieved from <https://biblat.unam.mx/es/revista/topicos-de-investigacion-y-posgrado/articulo/altamirano-bautista-adriana-manual-para-manejo-de-animales-de-laboratorio-mexico-facultad-de-estudios-superiores-zaragoza-unam-1994-98-p>
- McKeon, A., & Benarroch, E. E. (2018). Glial fibrillary acid protein: Functions and involvement in disease. *Neurology*, 90(20), 925–930. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005534>

- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
- Mishra, S. K., Singh, S., Shukla, S., & Shukla, R. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. *Neurochemistry International*, 113, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.11.012>
- Morris, R. G. M., Schenk, F., Tweedie, F., & Jarrard, L. E. (1990). Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: Dissociating components of allocentric spatial learning. *European Journal of Neuroscience*, 2(12), 1016–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1990.tb00014.x>
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608–619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
- Mullane, K., & Williams, M. (2019). Preclinical models of Alzheimer's disease: Relevance and translational validity. *Current Protocols in Pharmacology*, 84(1), 1–28. <https://doi.org/10.1002/cpph.57>
- O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 51(1). [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
- Olivares, J. D., Juárez, E., & García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*, (June), 20–28.
- Oswald, Wolf D., Gunzelmann, T., Rupprecht, R., & Hagen, B. (2006). Differential effects of single versus combined cognitive and physical training with older adults: The SimA study in a 5-year perspective. *European Journal of Ageing*, 3(4), 179–192. <https://doi.org/10.1007/s10433-006-0035-z>
- Oswald, Wolf Dieter, Rupprecht, R., Gunzelmann, T., & Tritt, K. (1996). The SIMA-project: Effects of 1 year cognitive and psychomotor training on cognitive abilities of the elderly. *Behavioural Brain Research*, 78(1), 67–72. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00219-7](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00219-7)
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates: hardcover edition. In *Academic Press*.
- Rai, S., Kamat, P. K., Nath, C., & Shukla, R. (2014). Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: The key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 117, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.035>
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2001).



- Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7340–7348. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-18-07340.2001>
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of messy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*, 9(6), 631–636. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3)
- Reyna Carrizales M., González Rubio M., López Esqueda F., G. G. G. (2014). Demencias. Una visión panorámica. In *V Simposio de Medicina Geriátrica* (Vol. 13).
- Rodrigues, L., Dutra, M. F., Ilha, J., Biasibetti, R., Quincozes-Santos, A., Leite, M. C.,... Gonçalves, C. A. (2010). Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. *Journal of Neural Transmission*, 117(11), 1295–1305. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0501-9>
- Rowland, H. A., Hooper, N. M., & Kellett, K. A. B. (2018). Modelling sporadic Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Neurochemical Research*, 43(12), 2179–2198. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2663-z>
- Ryman, D. C., Acosta-Baena, N., Aisen, P. S., Bird, T., Danek, A., Fox, N. C., Bateman, R. J. (2014). Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease. *Neurology*, 83(3), 253–260.
- S. Fanselow Michael, D. H.-W. (2011). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>.Are
- Salgado Puga, K. G., García Colunga J., López Hidalgo M., M. F. A. C. (2006). *Participación de los astrocitos de la región CA1 del hipocampo en la formación de la memoria de largo plazo facilitada por nicotina*. (1), 1–4.
- Salkovic-Petrisic, M., Knezovic, A., Hoyer, S., & Riederer, P. (2013). What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of Neural Transmission*, 120(1), 233–252. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>
- Santello, M., Toni, N., & Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature Neuroscience*, 22(2), 154–166. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8>
- SEMARNAT. (2011). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999*, 42(2), 2.

- Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer 's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., ... Morishita, R. (2010). Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A $\beta$  deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 7036–7041. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000645107>
- Valencia Marín, C. M., López Alzate, E., Tirado Pérez, V., Zea Herrera, M. del C., Lopera Restrepo, F., Rupprecht, R., & Oswald, W. D. (2008). Efectos cognitivos de un entrenamiento combinado de memoria y psicomotricidad en adultos mayores. *Revista de Neurología*, 46(08), 465. <https://doi.org/10.33588/rn.4608.2007571>
- Vargas Miranda, Bárbara; Ambriz García, Demetrio; Navarro Maldonado, Maria del Carmen; Trejo Córdova, Alfredo ; Rodríguez Esquivel, Gabriela ; González Vieira, M. del R. (2018). Manejo de animales del Bioterio de la UAM-I. *Manejo de Animales Del Bioterio de La UAM-I*, 24–32. Retrieved from <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/BIOTERIO.pdf>
- Ventura-Sobrevilla, J., Boone-Villa, V. D., Aguilar, C. N., Román-Ramos, R., Vega-Ávila, E., Campos-Sepúlveda, E., & Alarcón-Aguilar, F. (2011). Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 54, 5–9.
- Vicens, P., Redolat, R., & Del Carmen Carrasco, M. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: Metodología y aplicaciones. *Psicothema*, 15(4), 539–544.
- Wu, C., Yang, L., Tucker, D., Dong, Y., Zhu, L., Duan, R., ... Zhang, Q. (2018). Beneficial effects of exercise pretreatment in a sporadic Alzheimer's rat model. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 50(5), 945–956. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001519>
- Zappa Villar, M. F., López Hanotte, J., Falomir Lockhart, E., Trípodí, L. S., Morel, G. R., & Reggiani, P. C. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *Journal of Neural Transmission*, 125(12), 1787–1803. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>