



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REEVALUACIÓN DEL PAPEL DE LA MUERTE NEURONAL EN EL PROCESO
NEURODEGENERATIVO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA KAREN RAMÍREZ REYES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. EILEEN URIBE QUEROL

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE, 2022.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REEVALUACIÓN DEL PAPEL DE LA MUERTE NEURONAL EN EL PROCESO
NEURODEGENERATIVO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA KAREN RAMÍREZ REYES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. EILEEN URIBE QUEROL
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE, 2022.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/925/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de agosto de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** de la estudiante **RAMIREZ REYES ANA KAREN** con número de cuenta **307316161** con la tesis titulada **“REEVALUACIÓN DEL PAPEL DE LA MUERTE NEURONAL EN EL PROCESO NEURODEGENERATIVO”**, realizada bajo la dirección del **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
Vocal: DRA. VIOLETA GISSELLE LÓPEZ HUERTA
Vocal: DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
Vocal: DRA. ANAHI CHAVARRÍA KRAUSER
Secretario: DRA. EILEEN URIBE QUEROL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de octubre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido para poder realizar mis estudios. No. CVU: 1006770.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por su asesoría, apoyo y confianza.

A la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez y la Dra. Eileen Uribe Querol por sus comentarios y retroalimentación a lo largo del desarrollo del trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por confiar en mis ideas, por respaldar mi caminar en la ciencia e inspirarme cada día. Por enseñarme los principios fundamentales del pensamiento científico. Por ser tutor, colega, amigo y compañero.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos por la ayuda técnica otorgada, y por las discusiones científicas que siempre han contribuido a esclarecer y enriquecer mi perspectiva de la ciencia. Por la dedicación, constancia y entusiasmo con la que realizas tu trabajo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por la ayuda técnica otorgada en el área de microscopía y en la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica. ¡Muchas gracias por tu valioso apoyo Miguel!

A la Dra. Susana Castro Obregón y al Dr. Daniel Moreno Blas, por el apoyo técnico en la implementación del protocolo de beta-galactosidasa.

A las doctoras Elizabeth Hernández Echeagaray, Anahí Chavarría Krauser, Violeta López Huerta e Isabel Arrieta Cruz por sus valiosos comentarios y aportaciones al presente trabajo.

Al Lic. Jaime Madrid Barrera por su apoyo administrativo durante mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todos estos años de formación científica y humana. Agradezco todo lo que la Universidad me ha brindado: aprendizaje, recuerdos inolvidables y amigos para toda la vida.

A la sociedad mexicana que con su trabajo diario contribuye a mantener nuestra Universidad y hace posible que personas como yo recibamos formación académica y humana.

A Nico por brindarme herramientas para ser la mujer que deseo. Por tu apoyo incondicional. Por tu paciencia. Por enseñarme la valía del amor y la honestidad. Te amo mami.

A Sergio por darme la libertad de ser. Por confiar en mí. Te adoro Gigio.

A Nancy por tu paciencia y tus cuidados siempre amorosos. Eres la personificación de la entereza y la alegría. Eres un gran amor en mi vida.

A Migue por los recuerdos bonitos que compartimos. Sé que siempre celebras mis éxitos, así como yo celebro los tuyos.

A Liz por ser hermana y amiga, por acompañarme, cuidarme y caminar conmigo. ¡Te quiero mucho Lizilla!

A Karla, Paola, Emiliano y Elenita, por ser ejemplo de perseverancia, irreverencia, creatividad y franqueza.

A Gaby por ser mi cómplice, por ser el equilibrio y la sensatez que a veces me faltan, por darle orden a mis pensamientos. Por tu sinceridad, amistad y apoyo incondicional.

A Ruy por todo lo que compartimos. Por ser amigo y compañero de experiencias inesperadas. Por tu confianza y cariño sinceros. ¡Te quiero mucho Ruy Islas!

A Mary Octavia por acompañarme siempre. Por motivarme.

A Zan, Luis y Jorge por ser excelentes colegas y amigos. Por todas las conversaciones en las que aportaron nuevas perspectivas a mi trabajo.

A la belleza atigrada, por tu compañía. Sé que tu hermosa existencia está más allá de los posgrados y la codicia. Sin embargo, aquí estoy, agradeciéndote por los días en que tu patita ha sido apoyo y fortaleza.

A Jesús por el entusiasmo con el que me contagias cada día. Por enseñarme la belleza de la VIDA y la grandeza de los sucesos más cotidianos. Por alegrar mis días con los más diversos temas de conversación. Por tener el don de decir las palabras exactas en el momento justo.

A Gabriel por tu apoyo incondicional, por permitirme ser. Por darme la oportunidad de conocer tu parte más humana. Por el cariño sincero que compartimos.

A ti, amor de mis amores. Por permitirme crecer, florecer y madurar en tu compañía. Celebro el día en que la vida unió nuestros caminos. "Te amaré hasta el fin de los tiempos".

DEDICATORIA

A las mujeres de mi vida: Nico, Nancy y Liz. Por su amor, entereza y valentía.

A mi papá, por todas las enseñanzas.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Neurodegeneración	3
3.2. Mecanismos iniciadores de la muerte neuronal	3
3.2.1. Agregación tóxica de proteínas y respuesta a proteínas desplegadas	3
3.2.2. Neuroinflamación.....	5
3.2.3. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	5
3.2.4. Sistema ubiquitina-proteosoma	6
4. ANTECEDENTES	8
4.1. El número de neuronas no predice el deterioro cognitivo	8
4.2. Las neuronas de pacientes con enfermedad neurodegenerativa avanzada expresan marcadores antiapoptóticos	9
4.3. La acumulación generalizada de agregados tóxicos de proteínas no correlaciona con el déficit cognitivo, ni con marcadores de muerte celular	10
4.4. Senescencia celular	12
4.4.1. Fenotipo senescente	13
4.4.1.1. Daño persistente en el DNA	13
4.4.1.2. Modificaciones epigenéticas.....	14
4.4.1.3. Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)	14
4.4.1.4. Alteración lisosomal.....	15
4.4.2. Senescencia en células postmitóticas	16
4.4.3. Participación de la senescencia celular en los procesos neurodegenerativos.....	17
4.5. Heterocronía de los procesos neurodegenerativos en la corteza cerebral	17
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS	20
6.1. Objetivo general	20
6.2. Objetivos específicos.....	20
7. METODOLOGÍA	20
7.1. Animales	20
7.2. Administración de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)	20
7.3. Tejido cerebral.....	21
7.4. Inmunohistoquímica BrdU	21
7.5. Histoquímica para β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal).....	22
7.6. Análisis de fotografías	22
8. RESULTADOS	24
8.1. Cronoarquitectura de la corteza entorrinal	24
8.2. Cronoarquitectura de la corteza motora	28
8.3. Cronoarquitectura de la corteza somatosensorial	30
8.4. Heterocronía de la senescencia celular en el cerebro	34
8.4.1. Fenotipo senescente 1	36
8.4.2. Fenotipo senescente 2	36
8.4.3. Fenotipo senescente 3	38
8.4.4. Fenotipo senescente 4	40

9. DISCUSIÓN	42
10. CONCLUSIONES	45
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. RESUMEN

El modelo actual de la neurodegeneración propone a la muerte neuronal como el origen de las disfunciones conductuales y cognitivas. Sin embargo, algunos estudios muestran, que pacientes con enfermedad de Parkinson o Alzheimer presentan deterioro cognitivo en ausencia de muerte neuronal. Estos datos sugieren que, durante las fases iniciales e intermedias de la neurodegeneración, la muerte neuronal podría no ser el origen de la sintomatología. Un mecanismo alternativo para explicar la disfunción observada en etapas tempranas de la neurodegeneración, en ausencia de muerte neuronal, es la senescencia celular. Una célula en estado senescente se caracteriza por ser resistente a apoptosis, secretar factores proinflamatorios y favorecer el decline del potencial regenerativo. Por lo tanto, la acumulación de células senescentes en los circuitos neuronales podría favorecer un mal funcionamiento de las células vecinas, promoviendo así una disfunción generalizada en el sistema nervioso central. Es conocido que el proceso neurodegenerativo ocurre de manera asincrónica en la corteza cerebral, siendo las cortezas entorrinal y motora las más afectadas durante las etapas tempranas de este proceso. De manera interesante, las células que integran ambas cortezas durante la etapa adulta, son aquellas que se originaron de forma más temprana durante el desarrollo embrionario. Por el contrario, la corteza somatosensorial, la cual es poco sensible a daño por neurodegeneración, está integrada por células que se originaron en los últimos días embrionarios. Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue establecer si las neuronas de origen embrionario temprano expresan de manera anticipada el fenotipo senescente en la etapa adulta. De esta forma, el patrón de neurodegeneración asincrónico de la corteza cerebral, podría explicarse por la cronoarquitectura celular que se establece desde el periodo embrionario y hasta la etapa adulta.

Para fechar el nacimiento e identificar la ubicación anatómica de las neuronas en las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora, a 4 ratonas gestantes se les administró un marcador de proliferación celular (5-bromo-2'-desoxiuridina) entre los días embrionarios 11 y 14, cuando la neurogénesis está activa para formar la corteza cerebral. Las crías fueron sacrificadas a los 60 días posnatales. Al mismo tiempo, para determinar si las áreas corticales que alojan neuronas con un origen embrionario más temprano, eran más susceptibles a poseer células con fenotipo senescente, se evaluó cualitativamente la presencia en el citoplasma celular de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal). En contra de lo esperado, los resultados sugieren que las áreas corticales que alojan neuronas de origen más temprano no acumulan una mayor cantidad de células senescentes en ratones adultos jóvenes. Esta característica parece ocurrir independientemente del sexo. Es de notar que la distribución de células senescentes es heterogénea entre individuos y regiones cerebrales, lo que sugiere que no existe una correlación entre la senescencia y la muerte neuronal, cuando estos parámetros son evaluados en edades adultas jóvenes. En el futuro, se deberá implementar el uso de técnicas, que permitan evaluar con mayor precisión el día de nacimiento de las células senescentes, su estirpe celular y su microambiente. Así como establecer una correlación entre la acumulación de células senescentes y el desempeño cognitivo de los sujetos.

2. ABSTRACT

The prevailing neurodegeneration model proposes neuronal death as the origin of behavioral and cognitive dysfunctions. Nevertheless, some studies have shown that patients with Parkinson's and Alzheimer's disease exhibit cognitive impairment in the absence of neuronal death. These data suggest that during the initial and intermediate phases of neurodegeneration, neuronal death may not be the origin of the symptoms. An alternative mechanism to explain the dysfunction observed in the early stages of neurodegeneration, in neuronal death absence, is cellular senescence. A cell in a senescent state is characterized by being resistant to apoptosis, secreting pro-inflammatory factors, and favoring the decline of regenerative potential. Therefore, the accumulation of senescent cells within neuronal circuits could favor a malfunction of neighboring cells, promoting a generalized dysfunction in the central nervous system. It's known that the neurodegenerative process occurs asynchronously in the cerebral cortex, the entorhinal and motor cortices being the most affected during the early stages of this process. Interestingly, the cells that make up both cortices during adulthood are those cells that originated early during embryonic development. On the contrary, the somatosensory cortex, which isn't very sensitive to damage by neurodegeneration, is mainly made up of cells that originated in the last embryonic days. Taking the foregoing into account, the main goal of this study was to establish whether neurons of early embryonic origin express the senescent phenotype in advance in adulthood. In this way, the asynchronous neurodegeneration pattern of the cerebral cortex could be explained by the cellular chronoarchitecture that's established from the embryonic period to the adulthood.

To date the birth and identify the anatomical location of the neurons in the somatosensory, entorhinal, and motor cortices, 4 pregnant females mice were administered with a cell proliferation marker (5-bromo-2'-deoxyuridine) between 11-14 embryonic day, when neurogenesis is active to form the cerebral cortex. The mice pups were sacrificed at 60 postnatal days. At the same time, to determine if the cortical areas that have neurons with an earlier embryonic origin were more susceptible to having cells with a senescent phenotype expressing the senescent phenotype, the presence in the cell cytoplasm of the senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity, was qualitatively evaluated. Contrary to expectations, the results suggest that cortical areas that have neurons of earlier origin do not accumulate a greater number of senescent cells in young adult mice. This feature appears to occur regardless of sex. It is noteworthy that the distribution of senescent cells is heterogeneous between individuals and brain regions, which suggests that there is no correlation between senescence and neuronal death, when these parameters are evaluated in young adults. In the future, the use of techniques that allow a more accurate evaluation of the day of birth of senescent cells, their cell lineage and their microenvironment should be implemented. As well as establishing a correlation between the accumulation of senescent cells and the cognitive performance of the subjects.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Neurodegeneración

La neurodegeneración se caracteriza por un deterioro progresivo de la función neuronal, presuntamente ocasionado por la degeneración de las sinapsis, los axones, y en última instancia, la muerte de las células nerviosas (Andreone et al., 2019). La pérdida de poblaciones neuronales ocurre en el sistema nervioso central y periférico, es característica de enfermedades como Parkinson y Alzheimer, y conduce al deterioro cognitivo y a la demencia (Braak et al., 2003a; Braak et al., 2006).

3.2. Mecanismos iniciadores de la muerte neuronal

La muerte neuronal es un proceso que ocurre de manera normal durante el desarrollo, está altamente regulado y permite conservar la homeostasis de los tejidos, eliminando células que funcionan como blancos transitorios, supernumerarias, propensas a errores o defectuosas (Buss et al., 2006; Miura, 2012; Yamaguchi & Miura, 2015). Sin embargo, se ha propuesto que la muerte neuronal en la etapa adulta conduce a un declive funcional, y que es dicha muerte la que subyace a la progresión de la enfermedad neurodegenerativa (Andreone et al., 2019).

La pérdida neuronal, característica del proceso neurodegenerativo, es antecedida por una serie de mecanismos iniciadores que incluyen la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la neuroinflamación, la agregación de proteínas y las fallas en el sistema de degradación proteosomal (Andreone et al., 2019). Estos mecanismos, son la base del deterioro funcional y cognitivo asociado a la neurodegeneración, pueden ocurrir en paralelo y presuntamente dan paso a la muerte neuronal.

Una característica distintiva de la neurodegeneración es la agregación de proteínas consideradas como tóxicas. En la enfermedad de Alzheimer, los agregados están conformados por placas extracelulares de β -amiloide y ovillos neurofibrilares intracelulares de tau. Por su parte, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la presencia de inclusiones intracelulares de α -sinucleína, conocidas como cuerpos de Lewy (Schwartz & Ciechanover, 2009; McKinnon & Tabrizi, 2014).

3.2.1. Agregación tóxica de proteínas y respuesta a proteínas desplegadas

El mecanismo por el cual la agregación de proteínas conduce a la muerte neuronal no está claro. Sin embargo, una de las principales hipótesis sugiere que el plegamiento incorrecto de las proteínas mencionadas conduce a su agregación intracelular, circunstancia que estresa al retículo endoplásmico (RE) (Andreone et al., 2020). Dicho estrés activa mecanismos que permiten reestablecer la proteostasis de la célula suprimiendo transitoriamente la tasa de síntesis de proteínas, induciendo la expresión de genes que codifican chaperonas y foldasas, eliminando proteínas mal plegadas a través de la degradación lisosomal (Smith & Mallucci, 2016; Hetz & Saxena, 2017; Read & Schröder, 2021). Estos eventos aumentan la capacidad de plegamiento del RE, limitan la entrada de proteínas recién sintetizadas y facilitan la eliminación de las proteínas que se han acumulado (Maurel et al., 2014). Si

el mecanismo activado, conocido como respuesta a proteínas desplegadas (UPR por sus siglas en inglés), es insuficiente para reestablecer la homeostasis del RE, se desencadena un programa de muerte celular (Coelho & Domingos, 2014; Maurel et al., 2014).

La UPR es orquestada principalmente por tres proteínas transmembranales del RE: IRE1 (α , β), ATF6 y PERK (Hetz & Saxena, 2017; Read & Schröder, 2021). Todas ellas son mantenidas en estado inactivo por su asociación con la proteína BiP en el lumen del retículo endoplásmico. Cuando se acumulan proteínas desplegadas o mal plegadas, BiP se disocia y las tres proteínas adquieren su estado activo (Smith & Mallucci, 2016).

IRE1 posee dominios cinasa y endoribonucleasa (Hetz & Saxena, 2017). Tras adquirir su estado activo, IRE1 α se dimeriza y se autofosforila, induciendo la activación de su dominio endoribonucleasa para iniciar la edición del pre-RNA que codifica el factor de transcripción XBP1s, dando lugar a una proteína capaz de activar la transcripción de genes relacionados con el plegamiento de proteínas (Read & Schröder, 2021), incluyendo la inducción de chaperonas, la biogénesis de membranas y el control de calidad del RE (Coelho & Domingos, 2014). IRE1 β participa en un mecanismo de descomposición de RNA conocido como RIDD, cuya función es mantener la homeostasis de RE. Sin embargo, durante el estrés crónico, RIDD degrada al RNA que codifica a proteínas promotoras del crecimiento y la supervivencia celular (Maurel et al., 2014; Read & Schröder, 2021). Aunado a lo anterior, bajo condiciones irreversibles de estrés, IRE1 β también regula la apoptosis y la autofagia. El dominio citosólico de IRE1 β interactúa con Traf2 (factor 2 asociado a TNFR) y activa ASK1 (cinasa reguladora de la señal de apoptosis1), lo que desencadena la vía JNK (quinasa terminal cJun-N), activando así el mecanismo de apoptosis (Coelho & Domingos, 2014).

El estrés en el RE permite que ATF6 se trasloque al aparato de Golgi, en donde las endopeptidasas S1P y S2P lo escinden, y liberan un fragmento denominado ATF6f, éste se trasloca al núcleo e induce la expresión de XBP1 y de genes relacionados con el plegamiento de proteínas (Hetz & Saxena, 2017).

Cuando el estrés en el RE desencadena la activación de PERK (proteína cinasa activada con RNA), éste se dimeriza y se autofosforila (Smith & Mallucci, 2016). Una vez activado PERK, fosforila la subunidad α del factor de iniciación 2 (eIF2 α) en el citoplasma, inhibiendo así la síntesis de proteínas y previniendo una carga adicional sobre el RE (Smith & Mallucci, 2016; Hetz & Saxena, 2017). A su vez, la fosforilación de eIF2 α conduce a la síntesis selectiva del factor de transcripción ATF4 (factor de transcripción activador 4), encargado de regular al alza la producción de proteínas implicadas en el control redox, el metabolismo de aminoácidos y el plegamiento y síntesis de proteínas, permitiendo una restauración de la homeostasis celular (Smith & Mallucci, 2016; Hetz & Saxena, 2017). Cuando el estrés en el RE no es resuelto, ATF4 activa vías de muerte celular mediante la inducción del factor de transcripción CHOP (proteína homóloga del factor proapoptótico C/EBP), de especies reactivas de oxígeno y de miembros de la familia de reguladores de apoptosis Bcl-2 (proteína 2 de linfoma de células B) (Hetz & Saxena, 2017; Read & Schröder, 2021).

3.2.2. Neuroinflamación

La neuroinflamación es considerada como un componente clave en la progresión de la enfermedad neurodegenerativa y es promovida en primera instancia por la microglía, una población de células inmunitarias innatas residentes del sistema nervioso central (SNC) (Voet et al., 2019; Andreone et al., 2020).

Aunque se reconoce que la microglía lleva a cabo funciones de reparación en el SNC mediante la eliminación fagocítica de depósitos de β -amiloide, la acumulación constante de éstos puede provocar el cebado de las células microgliales, disminuyendo su eficiencia fagocítica (Voet et al., 2019). Se ha demostrado que los agregados de α -sinulceína y β -amiloide actúan como una señal endógena de estrés celular, activando así el inflamasoma NLRP3 (Andreone et al., 2020), un complejo citosólico multiproteico que al ensamblarse, activa la caspasa 1 proinflamatoria, responsable de la maduración y secreción de las citocinas inflamatorias IL-1 β e IL-18 (Codolo et al., 2013; Voet et al., 2019).

La neuroinflamación crónica favorece la muerte neuronal de múltiples formas. En primer lugar, la caspasa 1 provoca una forma proinflamatoria de muerte celular: la piroptosis. En este proceso es fundamental la proteína GSDMD (proteína ejecutora gasdermina D), un sustrato de la caspasa 1, que tras la escisión de su dominio amino terminal, se oligomeriza y perfora la membrana plasmática, induciendo la lisis celular (Voet et al., 2019). En segundo lugar, la presencia de la IL-1 β induce la fosforilación del receptor NMDA, activando el flujo de Ca²⁺ intracelular y promoviendo eventos de excitotoxicidad (Viviani et al., 2003). Por último, como parte de la respuesta inmune en el SNC, la microglía libera especies reactivas de oxígeno (ROS), cuando éstas se secretan de manera prolongada, se puede inducir el daño y la muerte neuronal (Shi & Holtzman, 2018).

3.2.3. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio que favorece la producción de ROS sobre las defensas antioxidantes (Ott et al., 2007). La mitocondria es el organelo encargado de regular la producción de ATP y la respiración celular (Valko et al., 2004). La síntesis de ATP ocurre en la membrana mitocondrial interna mediante la generación de flujos de electrones que corren a lo largo de la denominada cadena respiratoria, formada por un complejo de proteínas enzimáticas. El aceptor final del electrón es el oxígeno molecular (O₂) (Van Houten et al., 2006).

Incluso en condiciones ideales, una porción significativa de electrones puede escapar de la cadena de transporte de electrones en forma de aniones superóxido (O₂⁻), los principales precursores de las ROS (Valko et al., 2004; Van Houten et al., 2006; Ott et al., 2007). La dismutación de aniones superóxido por la superóxido dismutasa da como resultado la producción de H₂O₂ (Ott et al., 2007). El H₂O₂ normalmente se descompone en las mitocondrias por la glutatión peroxidasa. Sin embargo, el agotamiento del glutatión o la producción excesiva de H₂O₂ facilitan la escisión de H₂O₂ impulsada por el Fe²⁺, produciéndose así radicales hidroxilo (OH⁻) altamente reactivos capaces de dañar las

macromoléculas dentro de las mitocondrias (Van Houten et al., 2006; Ott et al., 2007). En este contexto, la respiración mitocondrial es una de las principales fuentes de estrés oxidativo (Islam, 2017).

La sobreproducción de ROS puede causar la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), una vez activado éste se trasloca al núcleo y promueve la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-18), y del inflammasoma NLRP3. Una vez que NLRP3 está activado, la pro-caspasa 1 se escinde para formar la caspasa 1 bioactiva, dando paso a la muerte celular (Yarmohammadi et al., 2020). Otro efecto potencialmente nocivo de la producción de ROS en las mitocondrias es la pérdida de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , las mitocondrias pueden captar y retener Ca^{2+} . Sin embargo, si el Ca^{2+} acumulado supera cierto umbral de concentración, es liberado de las mitocondrias. La salida de Ca^{2+} interrumpe la homeostasis de solutos, y provoca cambios drásticos en la estructura y función mitocondriales (Ott et al., 2007). El Ca^{2+} es importante para el mecanismo de neurotransmisión y la plasticidad neuronal, por lo tanto, cualquier alteración en la homeostasis de Ca^{2+} potencia la excitotoxicidad (Islam, 2017).

Por último, cuando las ROS inducen una disfunción en el DNA mitocondrial (mtDNA), las mitocondrias agotan su eficiencia para reparar el daño, debido a la oxidación de las proteínas involucradas en los mecanismos de reparación y a la capacidad comprometida para importar, desde el núcleo hacia la matriz mitocondrial, proteínas de reparación recién formadas. Así, la disfunción mitocondrial inducida por estrés oxidativo, ocasiona un daño persistente en el mtDNA, provocando una producción ineficiente de ATP, comprometiendo la viabilidad y supervivencia celular (Van Houten et al., 2006).

3.2.4. Sistema ubiquitina-proteosoma

El plegamiento eficiente de polipéptidos recién sintetizados y la eliminación rápida de proteínas mal plegadas son fundamentales para el mantenimiento de la proteostasis celular. Esta homeostasis es posible mediante la participación conjunta de chaperonas moleculares y sistemas de eliminación proteolítica, entre las que se incluye al sistema ubiquitina-proteosoma (UPS por sus siglas en inglés) (McKinnon & Tabrizi, 2014). La ruta proteolítica de la ubiquitina, es una vía altamente conservada y desempeña un rol fundamental en la degradación de la mayoría de las proteínas celulares, incluidas las de vida corta, mal plegadas y desnaturalizadas. Por consiguiente, es importante en una variedad de procesos celulares básicos entre los que destacan: la regulación del ciclo celular, la respuesta celular al estrés y la reparación del DNA (Schwartz & Ciechanover, 2009).

Las proteínas se marcan para la degradación proteosomal mediante la conjugación covalente de ubiquitina, en una cascada de reacciones de tres pasos. Inicialmente, la ubiquitina se activa a través de la formación de un enlace tioéster de alta energía ubicado entre el sitio activo de cisteína de la enzima activadora de ubiquitina (E1) y el extremo carboxilo de la ubiquitina; es una reacción dependiente de ATP (Gong et al., 2016). El resto de la ubiquitina activada, es posteriormente transportado de E1 a E2, una enzima conjugadora de ubiquitina, creando un segundo intermediario de tioéster de alta energía. Una tercera clase de enzima, las ligasas de ubiquitina E3, median la unión

covalente de cadenas de poliubiquitina. Las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y posteriormente degradadas por el proteosoma 26S, un complejo proteolítico dependiente de ATP (McKinnon & Tabrizi, 2014).

Deficiencias en la eliminación de proteínas mal plegadas, como consecuencia de un mal funcionamiento en los mecanismos de degradación proteosomal, conducen a la agregación de proteínas intracelulares, citotoxicidad y muerte celular (Gong et al., 2016). Debido a que el mecanismo de degradación proteosomal es dependiente de ATP, fallas en el funcionamiento mitocondrial promueven deficiencias en la actividad proteosomal, y con ello favorecen la agregación tóxica de proteínas (Yarmohammadi et al., 2020).

En resumen, el enfoque predominante en investigación se ha concentrado en describir una serie de mecanismos que dan paso a la muerte celular, la cual se ha planteado para explicar la etiología y progresión de la enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, aun cuando el modelo señala a la muerte neuronal como la manifestación final del proceso neurodegenerativo, existe una desconexión entre los mecanismos iniciadores y la activación posterior de la muerte celular (Andreone et al., 2019). Si bien es cierto que las neuronas se enfrentan a una amplia variedad de estímulos que pueden conducir a la muerte, incluyendo estrés oxidativo, agregados tóxicos de proteínas y estrés metabólico, la evidencia experimental sugiere que las etapas iniciales e intermedias de la neurodegeneración progresan en ausencia de muerte neuronal. Estudiar los eventos que anteceden a esta última, por tanto, se torna fundamental para entender la naturaleza de la enfermedad neurodegenerativa. Este trabajo evaluó una de las posibles alternativas.

4. ANTECEDENTES

4.1. El número de neuronas no predice el deterioro cognitivo

Las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer se caracterizan por el deterioro progresivo de la función cognitiva, presuntamente ocasionado por la pérdida y disfunción generalizada de las células neuronales. Sin embargo, la primera falla que emana del planteamiento de la muerte celular, es que de hecho, la pérdida de poblaciones celulares se ha reportado en individuos sin antecedentes de deterioro cognitivo y demencia.

West et al. (1994) evaluaron el número de neuronas en cinco subdivisiones de la región hipocampal: la capa de células granulares del giro dentado, el *hilus*, la capa de células piramidales de los campos CA2-3, la capa de células piramidales del campo CA1 y las capas celulares del *subiculum*. Las estimaciones fueron hechas a un grupo de 7 pacientes con diagnóstico clínico y patológico de Alzheimer. Como puede observarse en la figura 1, el área con menor número de células en función del avance de la edad fue la región CA1, en donde pacientes con Alzheimer mostraron en promedio un 68% menos de células que el grupo control y el grupo control pareado por edad. Por lo que respecta a las subdivisiones restantes de la región hipocampal, se observa que las poblaciones neuronales de los tres grupos muestran un número de neuronas similar entre grupos de edad, independientemente de la presencia o ausencia de deterioro cognitivo o enfermedad neurológica. Lo anterior significa que el número de neuronas en las subregiones clave en el procesamiento de memoria, como los campos CA2-3 y el giro dentado, no muestra una caída significativa en algunos grupos de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Además, es importante señalar que individuos jóvenes sin deterioro cognitivo, muestran números poblacionales parecidos a los pacientes con presencia de enfermedad neurodegenerativa. Esta evidencia, señala el hecho de que el número de neuronas hipocampales no predice el nivel de deterioro cognitivo.

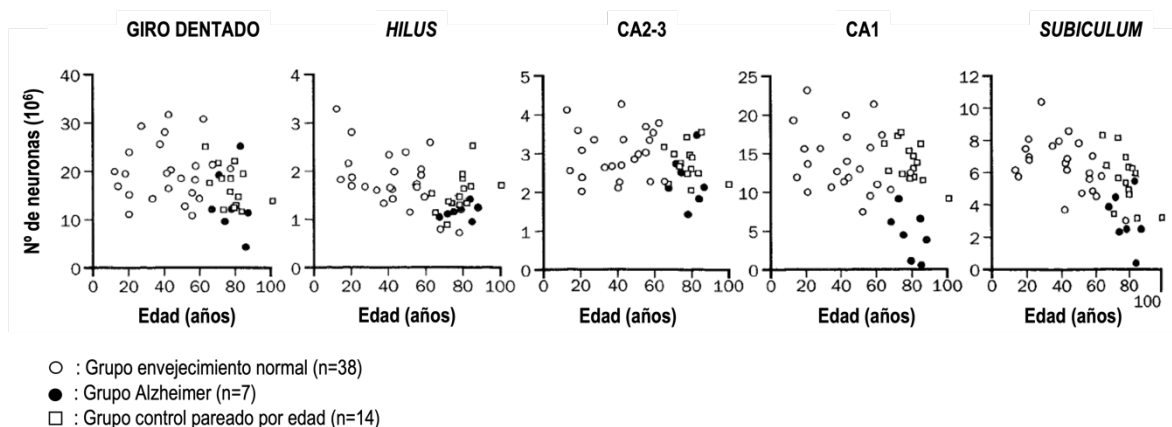


Figura 1. El número absoluto de neuronas no predice el nivel de deterioro cognitivo al paso del tiempo. Gráficas de dispersión que muestran el número de neuronas en distintas regiones del hipocampo en individuos de edad creciente. Modificada de West et al., 1994.

4.2. Las neuronas de pacientes con enfermedad neurodegenerativa avanzada expresan marcadores antiapoptóticos

Una de las principales limitaciones que supone el planteamiento de la muerte celular como sostén para explicar la neurodegeneración, es que los mecanismos propuestos requieren de tiempos cortos para conducir a la célula hacia la muerte. Esta circunstancia los hace incompatibles con la progresión lenta de la degeneración neuronal y con la larga latencia clínica de las diferentes enfermedades neurodegenerativas. Esta disyunción temporal, aunada a la evidencia experimental que muestra la expresión de marcadores antiapoptóticos en neuronas de pacientes con enfermedad neurodegenerativa, pone en duda que la muerte celular dé origen al proceso neurodegenerativo.

Jellinger & Stadelmann (2001) evaluaron *postmortem* el tejido cerebral de 9 pacientes con diagnóstico neuropatológico de Alzheimer, 5 casos confirmados de Parkinson y un grupo control de 7 individuos pareados por edad sin presencia de enfermedad cerebral. La cuantificación del número de neuronas en el hipocampo de los pacientes con Alzheimer mostró que de 4,000 células contabilizadas una sola célula fue positiva para la caspasa 3 activa. Por el contrario, en la misma región se contabilizaron una gran cantidad de células positivas a Bcl-2 y Bcl-X, ambos marcadores antiapoptóticos. Un resultado similar fue observado en la sustancia nigra de pacientes con enfermedad de Parkinson, quienes presentaron numerosas neuronas positivas a Bcl-X, no así para la caspasa 3 activa, molécula que no se expresó en ninguna de las neuronas evaluadas.

En concordancia con estas observaciones, Zhu et al. (2004) reportaron que la proteína Bcl-w, actúa como un promotor de la sobrevivencia celular en la neurodegeneración. Así lo reveló una serie de experimentos en los que se reportó un incremento significativo en la expresión de Bcl-w en neuronas piramidales del hipocampo en pacientes con Alzheimer, en comparación con el grupo control en los cuales la expresión de la proteína fue baja. Es de relevancia enfatizar que la expresión de Bcl-w se incrementó en asociación con ovillos neurofibrilares y placas neuríticas. Para confirmar la participación de Bcl-w como protector contra la muerte neuronal, se generó una línea celular que sobre expresaba Bcl-w. El primer experimento consistió en exponer a las células durante 24 horas a estaurosporina (100 nM), un agente inductor de apoptosis. El 90% de las células no transfectadas murieron, mientras que únicamente el 15% de las células con sobreexpresión Bcl-w murieron. En el segundo experimento, las células transfectadas con Bcl-w fueron expuestas a una concentración de 10 μ M de A β -fibrilada (f-A β). Después de un periodo de 48 horas, la muerte observada fue significativamente menor en las neuronas capaces de sobre producir Bcl-w que en el grupo de células no trasfectadas.

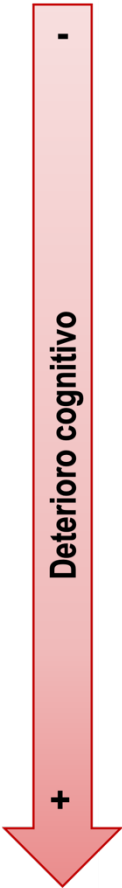
Tomados juntos, estos resultados sugieren que las neuronas afectadas por los acúmulos de proteínas procuran sobrevivir movilizando un mecanismo de protección mediado por proteínas anti-apoptóticas (Zhu et al., 2004). Este hecho, disminuiría la posibilidad de observar muerte neuronal durante las etapas tempranas e intermedias del proceso neurodegenerativo.

4.3. La acumulación generalizada de agregados tóxicos de proteínas no correlaciona con el déficit cognitivo, ni con marcadores de muerte celular

La acumulación anormal de agregados tóxicos de proteínas y la muerte neuronal son el principal marcador histopatológico de las enfermedades neurodegenerativas. No obstante, para el caso de la enfermedad de Alzheimer, se ha documentado que algunos individuos conservan la función cognitiva pese a la presencia de ovillos neurofibrilares (Zolocheska et al., 2018).

Zolocheska et al. (2018) documentaron la historia clínica de 24 individuos en un rango de edad de los 76 a los 89 años. Aún estando vivos, todos los casos incorporados al estudio fueron evaluados anualmente neurológica y neuropsicológicamente, y diagnosticados con demencia clínica (CDR) por un médico experimentado. Dicha escala va de 0-3. Puntuaciones <1 indican ausencia de pérdida de memoria. Mientras que puntuaciones >1 indican pérdida de memoria grave. Tanto el grupo control, como el grupo de individuos sin demencia con neuropatología de Alzheimer (NDAN) tuvieron exámenes cognitivos y funcionales normales con CDR <1. Por su parte, los sujetos que conformaron el grupo Alzheimer, cumplieron con los criterios diagnósticos para la enfermedad y una puntuación CDR de más de 1. Cada individuo fue asignado en un estadio de Braak (0-6, siendo 6 el más grave; Braak et al, 2003b), indicativo del nivel y la ubicación anatómica de los ovillos hiperfosforilados de tau. En promedio, el grupo control (n=8) se ubicó en la etapa 2.4 de Braak. Por el contrario, el grupo de pacientes diagnosticados con Alzheimer (n=8) y el grupo NDAN (n=8) en promedio se ubicaron en la etapa 4 y 4.5, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Relación entre la ubicación de agregados neurofibrilares y el deterioro cognitivo en cerebros de cadáveres de individuos que fueron diagnosticados o no con enfermedad de Alzheimer. La presencia de ovillos neurofibrilares no predice el deterioro cognitivo. Modificada de Zolochavska et al., 2018. Tabla realizada en biorender.com.



Grupo	Edad	Sexo	Etapa Braak
Control	88	F	1
	>89	M	1
	>89	F	3
	>89	F	3
	>89	F	2
	>89	F	3
	86	M	3
	>89	M	3
Promedio		3/5	2.4
NDAN	>89	M	4
	88	M	5
	89	F	4
	>89	F	4
	76	F	5
	>89	F	6
	87	F	4
	86	M	4
Promedio		3/5	4.5
Alzheimer	>89	M	4
	87	F	4
	>89	F	4
	>89	F	4
	>89	M	4
	>89	F	4
	>89	M	4
	>89	F	4
Promedio		3/5	4.0

Esta evidencia expone otra limitación del modelo actual de neurodegeneración: el principal biomarcador histopatológico de la enfermedad neurodegenerativa, no predice en todos los casos la presencia ni el desarrollo del deterioro cognitivo. Más importante aún es la evidencia de que la mayoría de las neuronas que contienen los ovillos neurofibrilares, no fueron positivas para marcadores de muerte celular. Así lo mostraron los datos publicados por de Calignon et al. (2009). Los autores del trabajo utilizaron un modelo animal de Alzheimer, ratones rTg4510 de 7 a 9 meses de edad (n=6). A los animales se les realizó una craneotomía con el objetivo de seguir *in vivo* durante 24 horas, la patología fibrilar en la corteza cerebral, característica de estos ratones. Para estudiar el papel de la muerte celular asociada a la formación de los ovillos neurofibrilares, se administró directamente en el cerebro un indicador fluorescente de activación de caspasa y yoduro de propidio (PI). El PI es excluido

de las células que mantienen sus membranas intactas, pero puede acceder a las células muertas o moribundas.

El análisis reveló que del total de células con presencia de ovillos neurofibrilares, únicamente el 6% tuvo núcleos positivos para PI, denotando la falta de integridad de la membrana. De estas últimas células, aproximadamente el 80% fueron positivas al indicador de caspasa activa. En otras palabras, una minoría de neuronas conteniendo ovillos fibrilares es la que parece estar muriendo (Calignon et al., 2009).

Para investigar la integridad de núcleo celular de las neuronas con ovillos marcadas con PI, se aplicó una solución de Hoechst 33342 sobre la superficie del cerebro, utilizado como colorante supravital. Debido a que es un colorante lipofílico, Hoechst penetró el tejido cerebral y atravesó las membranas celulares intactas. Después de 24 horas los animales fueron sacrificados. Se obtuvieron rebanadas coronales del cerebro que fueron utilizados para realizar un conteo estereológico que permitiera conocer el porcentaje de neuronas positivas a ovillos neurofibrilares que contenían un núcleo positivo para Hoechst. Se observó que las células con ovillos neurofibrilares asociadas con marcadores de muerte en el primer día, contenían núcleos positivos para Hoechst. El análisis *post mortem* de los cerebros mostró que 233 neuronas de 234 contuvieron ovillos neurofibrilares y núcleos positivos de Hoechst. Esto significa que contrario a lo esperado, las neuronas teñidas con PI no murieron durante las 24 horas previas al procedimiento de tinción supravital. Además, la presencia de núcleos positivos para Hoechst en ellas al día siguiente indica que la pérdida de integridad de la membrana asociada a ovillos neurofibrilares, y la activación de caspasa, no conducen a la muerte inmediata de las neuronas.

Podemos concluir que el modelo predominante que propone a la muerte celular como la causa de la neurodegeneración tiene tres limitaciones fundamentales: 1) la muerte celular no predice la presencia del deterioro cognitivo y la demencia; 2) las neuronas con placas de β -amiloide expresan proteínas antiapoptóticas; y 3) la presencia de agregados de proteínas no conduce a la muerte celular, incluso ante la pérdida de integridad de la membrana y en presencia de caspasa activa. En adición a estas deficiencias de predicción en el modelo, debemos considerar que las medidas terapéuticas propuestas a la fecha, no han logrado resolver la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. Por consiguiente, el conjunto de evidencia sugiere que dichas explicaciones son insuficientes para proveer de un esclarecimiento satisfactorio del problema científico que pretenden modelar.

4.4. Senescencia celular

Un proceso biológico alternativo que permitiría unificar la evidencia que contradice el mecanismo de muerte neuronal en el modelo de neurodegeneración es la senescencia celular. La senescencia celular fue descrita por Hayflick & Moorhead en 1961. Los experimentos realizados por estos investigadores mostraron que los fibroblastos tienen una capacidad finita para dividirse en cultivo. Actualmente, la senescencia celular puede definirse como un proceso homeostático que reduce la proliferación y ayuda a prevenir la propagación de células dañadas. De acuerdo con su duración, la senescencia se

ha categorizado en aguda y crónica. La primera se ha implicado en el desarrollo embrionario y la reparación del tejido, mientras que la senescencia crónica contribuye al envejecimiento y la neurodegeneración (Martínez-Cué & Rueda, 2020).

4.4.1. Fenotipo senescente

Diferentes tipos de células en el SNC pueden adquirir el fenotipo senescente: astrocitos, oligodendrocitos, neuronas y células troncales neurales (Martínez-Cué & Rueda, 2020). Con frecuencia las células senescentes son resistentes a señales de muerte celular (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007), mediante la expresión de numerosas proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-w y Bcl-xL (Si et al., 2021). Las células senescentes expresan un fenotipo distintivo que incluye daño persistente en el DNA, fenotipo secretor asociado a senescencia y cambios en el metabolismo celular. El fenotipo senescente se resume en la figura 2.

4.4.1.1. Daño persistente en el DNA

Diferentes factores intrínsecos y extrínsecos en la célula pueden ocasionar rupturas de doble cadena del DNA (DSB) (Kumari & Jat, 2021). Cuando el daño al DNA es grave las células sufren muerte celular por apoptosis. Sin embargo, las células pueden optar por un destino adicional e iniciar la senescencia celular, inducida por la señalización del mecanismo de respuesta al daño en el DNA (DDR) (d'Adda di Fagagna, 2008). Aunque no está claro qué determina la elección entre apoptosis y senescencia, la decisión podría estar en función de la intensidad, duración y naturaleza del daño (d'Adda di Fagagna, 2008).

El DNA monocatenario y las DSB son detectados por complejos especializados que activan a ATR (Ataxia Telangiectasia y relacionada con Rad 3) y ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada), respectivamente. El reclutamiento de estas cinasas en el sitio de lesión provoca la fosforilación local de la histona H2AX. La forma fosforilada de H2AX (γH2AX) recluta complejos adicionales ATM para así propagar los focos nucleares de γH2AX a lo largo de la cromatina. Las proteínas MDC1 y 53BP1, facilitan el reclutamiento de complejos ATM para aumentar el nivel de fosforilación y reclutar factores de reparación del DNA. Cuando el daño en el DNA induce que la actividad local de ATM y ATR aumenten por encima de cierto umbral, el punto de control cinasa CHK2 se activa por la fosforilación de ATM. De forma similar, CHK1 (cinasa de punto de control 1) se activa principalmente por la fosforilación de ATR. Éstos a su vez activan mediante la fosforilación a p53, el encargado de inducir la transcripción de p21, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, dando como resultado un paro estable del ciclo celular (d'Adda di Fagagna, 2008; Di Mico et al., 2021).

Los estímulos que desencadenan la DDR también pueden participar en la vía p16- pRB. Sin embargo, esto generalmente ocurre de forma secundaria a la participación de la vía p53. Tanto p16 como p21 son inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKI). Por lo tanto, pueden mantener a pRB

en una forma hiperfosforilada activa, evitando así que E2F transcriba genes que son necesarios para la proliferación (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007, Kumari & Jat, 2021).

4.4.1.2. Modificaciones epigenéticas

La mayoría de las células senescentes muestran cambios en su epigenoma y en la organización de la cromatina, dichos cambios incluyen un desequilibrio en las marcas de histonas, la formación de focos heterocromáticos asociados a la senescencia (SAHF), alteraciones en el patrón de metilación del DNA y cambios en la organización espacial del genoma (Martínez-Cué & Rueda, 2020; Di Mico et al., 2021).

Modificaciones específicas en las histonas se han correlacionado con estados de cromatina activos o reprimidos, la trimetilación de la lisina 4 y 27 en la histona H3 (H3K4me3 y H3K27me3), respectivamente, son modificaciones epigenéticas con controles opuestos en la transcripción relacionada con la regulación de la longevidad. H3K4me3 es una modificación activadora que impulsa la transcripción. Por el contrario, H3K27me3 es una modificación represiva que marca la heterocromatina facultativa. El desequilibrio de estas marcas de histonas activadoras y represoras son observables en la senescencia y el envejecimiento (Yang & Sen, 2018).

El cambio epigenético más notable en la senescencia es la formación de SAHF. Éstos son reordenamientos espaciales a gran escala de la cromatina, y se forman por la condensación de cromosomas en un solo foco SAHF (Yang & Sen, 2018; Si et al., 2021). Los SAHF se caracterizan por la presencia de proteínas y marcas represivas de la cromatina (e.g., H3K9me3), de proteínas heterocromáticas HP1, y por la exclusión de marcas eucromáticas (e.g., H3K9ac, H3K4me3 y la histona enlazadora H1; Yang & Sen, 2018; Di Mico et al., 2021).

En el espacio genómico, los SAHF coinciden con regiones de replicación tardía (Yang & Sen, 2018). Sin embargo, no son marcadores universales de senescencia ya que se han asociado principalmente a la senescencia celular inducida por la activación de oncogenes (Di Mico et al., 2021).

4.4.1.3. Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)

Otra característica importante de la senescencia celular es el desarrollo de un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), caracterizado por la síntesis y liberación de quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento, ROS y metaloproteinasas, todas ellas responsables de los procesos neuroinflamatorios (Martínez-Cué & Rueda, 2020; Si et al., 2021).

El SASP se ha planteado como un mecanismo que pudo originarse para ayudar a las células senescentes dañadas a comunicarse con las células vecinas sobre su estado comprometido, para iniciar la reparación del tejido. Sin embargo, la secreción crónica de componentes proinflamatorios como IL-6 e IL-8 tienen el potencial de alterar el microambiente, provocando efectos nocivos asociados

con la exacerbación de la proliferación, la angiogénesis y la inflamación celulares (Lopes-Paciencia et al., 2019; Kumari & Jat, 2021).

La expresión del SASP se ha asociado con un daño persistente en el DNA. El daño del DNA y la DDR no inducen la secreción de citocinas inflamatorias cuando la célula repara eficientemente el daño. Sin embargo, cuando se inducen de manera persistente focos de daño en el DNA y se activa la señalización DDR, aumenta la secreción de IL-6 e IL-8 (Rodier et al., 2009). Se sabe que diferentes elementos de la DDR como ATM, NBS1 y CHK2 preparan a los genes SASP para la activación; el agotamiento de estos reguladores DDR disminuye la producción de citocinas en respuesta al estrés genotóxico. Por el contrario, la inhibición de p53 aumenta la expresión de SASP, lo que puede contribuir a la generación de un microambiente inflamatorio (Rodier et al., 2009; Di Mico et al., 2021).

Debido a que los niveles del factor de transcripción GATA4 aumentan después de la activación de la DDR en las células senescentes, ha sido implicado en el establecimiento del SASP. GATA4 activa la transcripción de una multitud de genes implicados en la respuesta inmune y en la inflamación, incluyendo aquellos que codifican a IL-6 e IL-8 y proteasas de la matriz extracelular (Di Mico et al., 2021). GATA4 actúa como un vínculo molecular entre la señalización DDR y la posterior activación de NF- κ B para el establecimiento completo de SASP. NF- κ B regula la transcripción de proteínas inflamatorias como IL-1 α , IL-6 e IL-8, las cuales a su vez regulan positivamente la actividad de NF- κ B, mejorando así la señalización SASP (Di Mico et al., 2021, Kumari & Jat, 2021).

4.4.1.4. Alteración lisosomal

Los lisosomas son los organelos catabólicos más importantes de la célula. Su capacidad de degradación depende de una condición altamente ácida (pH 4- 4.5). Cuando el pH no se mantiene en el rango óptimo la actividad enzimática se reduce, y genera productos de digestión tóxicos y/o productos intermedios parcialmente digeridos (Park et al., 2018). En las células senescentes los lisosomas aumentan en número y tamaño, cambios que han sido atribuidos principalmente a un aumento en el número de lisosomas que contienen materiales no digeribles como las lipofuscinas. Estos orgánulos también incrementan en número como un mecanismo compensatorio para equilibrar el exceso de lisosomas disfuncionales (Park et al., 2018; Si et al., 2021). La actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) es considerada como un biomarcador de disfunción lisosomal asociado con la senescencia (Matjusaitis et al., 2016; Park et al., 2018; Si et al., 2021).

Por su parte, la autofagia es un proceso catabólico conservado evolutivamente, que permite la degradación de componentes intracelulares como proteínas, lípidos y organelos a través de los lisosomas (Park et al., 2018; Moreno et al., 2019). La fusión de los lisosomas con los autofagosomas, es dependiente del pH lisosomal. Por lo tanto, un pH alterado modifica la actividad de las enzimas lisosomales y ocasiona un deterioro en la degradación autofágica, reduciendo así la degradación de sustratos dependientes de autofagia (Park et al., 2018). Como se mencionó previamente, las mitocondrias son organelos altamente dinámicos que generan la mayor parte del ATP celular. La

autofagia y los lisosomas desempeñan un papel importante en la homeostasis mitocondrial. Las células senescentes, con fallas en los sistemas de degradación lisosomal y autofágica, son incapaces de degradar a las mitocondrias dañadas y de facilitar el recambio de éstas, situación que conduce a un aumento en la producción de ROS y de los daños celulares asociados al consecuente estrés oxidante (Si et al., 2021).

4.4.2. Senescencia en células postmitóticas

Aunque inicialmente la senescencia celular fue un término asignado a las células mitóticas, la observación de que las células diferenciadas pueden acumular daño persistente en el DNA y marcadores DDR, planteó la posibilidad de que la señalización persistente de daño en el DNA podría conducir a la expresión de inhibidores del ciclo celular, y al establecimiento del fenotipo senescente en células diferenciadas (Di Micco et al., 2021).

Jurk et al. (2012) estudiaron la senescencia en neuronas. Se detectaron marcadores de señalización DDR, inducción de heterocromatina y activación de SASP, incluida la secreción de IL-6 y la acumulación de SA-β-gal, en diferentes tipos de neuronas en ratones con el avance de la edad. La pérdida de p21 redujo la expresión de estos marcadores, indicando que p21 es un transductor necesario entre la DDR y el establecimiento del fenotipo senescente. Con base en esta evidencia, los autores propusieron que el daño acumulado en el DNA puede inducir una DDR que conduce a las neuronas a expresar un fenotipo senescente. Estas neuronas podrían ser una fuente de estrés oxidativo e inflamatorio, y contribuir al envejecimiento.

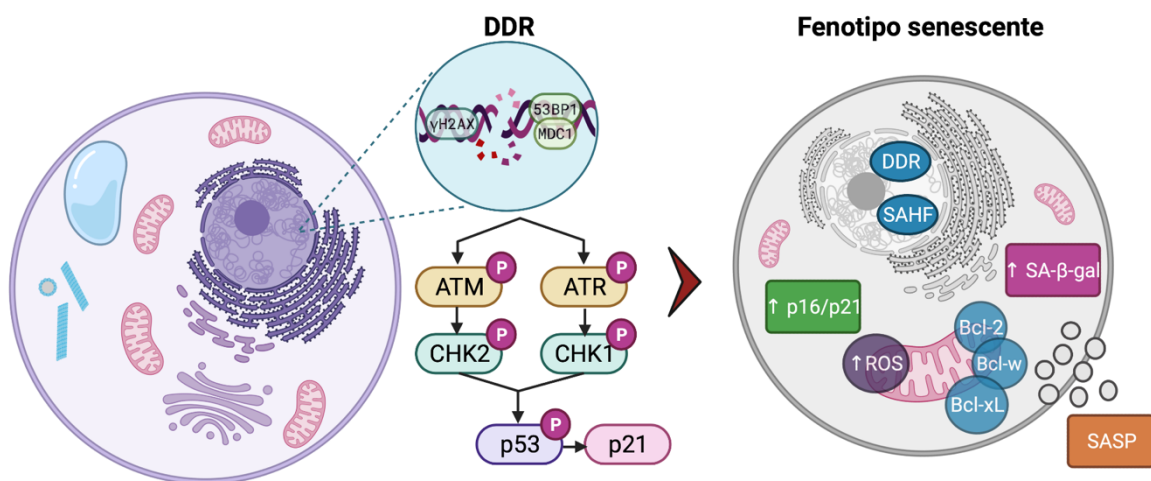


Figura 2. Esquema que ilustra la cascada de eventos, denominada respuesta al daño del DNA (DDR), que sobrevienen al daño extenso y crónico del DNA. Una activación prolongada de la DDR desencadena la senescencia. La activación prolongada de DDR se acompaña de la detención del ciclo celular (detectada por un aumento en la expresión de inhibidores del ciclo celular p21 y p16), el daño oxidativo (niveles elevados de ROS), la regulación positiva de la familia Bcl-2 de proteínas antiapoptóticas, cambios metabólicos (incluida la acumulación de β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-gal)), focos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF) y, un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Figura realizada en biorender.com.

4.4.3. Participación de la senescencia celular en los procesos neurodegenerativos

Debido a que el fenotipo senescente puede expresarse en diferentes tipos celulares residentes del SNC, la senescencia celular ha sido abordada como un proceso involucrado en la neurodegeneración (Si et al., 2021). Evidencia obtenida en humanos y animales experimentales sugiere que la senescencia celular puede estar relacionada con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer y Huntington (Bhat et al., 2012; Bussian et al., 2018; Musi et al., 2018). Sin embargo, debido a la complejidad de ambos fenómenos, se requiere más evidencia científica que permita dilucidar el papel de la senescencia en las enfermedades neurodegenerativas.

De acuerdo con las características descritas como parte del fenotipo senescente, las células en este estado podrían contribuir al proceso neurodegenerativo, principalmente de tres formas:

1. Debido a que las células senescentes son resistentes a apoptosis, la senescencia podría promover la retención de neuronas envejecidas y/o favorecer la conservación de neuronas en números mayores a los requeridos en los circuitos neuronales.
2. Las células senescentes son una fuente de estímulos proinflamatorios y prooxidantes, lo que podría modificar el microambiente del cerebro, así como su estructura y función.
3. Las células en estado senescente podrían afectar a otras células en su entorno, induciendo un fenotipo senescente en células circundantes.

Si analizamos las limitaciones del modelo actual de neurodegeneración en función de la senescencia celular, podemos proponer que:

1. La senescencia celular podría explicar por qué pacientes con deterioro cognitivo y demencia no muestran, en todos los casos, pérdida de poblaciones neuronales. Las células podrían estar presentes en estado senescente, y no funcionar correctamente en los circuitos neuronales.
2. La senescencia celular explicaría por qué la muerte celular no es observable en todos los casos. Una célula en estado senescente puede ser contabilizada, aunque se encuentre en un estado disfuncional.

De esta forma, la disfunción observada en etapas tempranas e intermedias de la neurodegeneración podría explicarse como el resultado de la acumulación de células disfuncionales en estado senescente, y no como una consecuencia de la muerte celular.

4.5. Heterocronía de los procesos neurodegenerativos en la corteza cerebral

Tomando en cuenta que la senescencia celular se ha relacionado con el envejecimiento y la neurodegeneración, y que daños sostenidos en el DNA han sido propuestos como el origen de este

fenotipo, es probable que la senescencia opere como un mecanismo de envejecimiento celular asociado a la edad cronológica de las células. Es decir, células más viejas que han estado sometidas durante más tiempo a diferentes factores de estrés ambientales intrínsecos y extrínsecos, serán más susceptibles de acumular daño en su DNA, promoviendo una DDR sostenida y favoreciendo que se establezca el fenotipo senescente.

Utilizando un trazador radioactivo de DNA (^3H -timidina), administrado durante el desarrollo embrionario, Bayer (1980) y Bayer & Altman (1991) estudiaron la citoarquitectura de la corteza cerebral. Para evaluar el destino celular, los animales fueron sacrificados a los 60 días posnatales. De acuerdo con el día de origen, las células se clasificaron en: viejas, células nacidas entre el día embrionario 13 y el día embrionario 15; edad intermedia, nacidas entre los días embrionarios 16 y 17; y jóvenes, aquellas células que se originaron entre los días embrionarios 18 y 20. El análisis de los gradientes neurogénicos indica que las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora muestran un patrón de organización asincrónico que proporciona una edad celular diferente a cada corteza.

Las cortezas entorrinal y motora están integradas en su mayoría por células viejas (40% y 51%, respectivamente). Sin embargo, la corteza motora posee el doble de células nuevas (12%) que la corteza entorrinal (6%). Por el contrario, la corteza somatosensorial se constituye por un bajo porcentaje de células viejas (14%), y un porcentaje de células nuevas mayor al doble con respecto al observado en las cortezas entorrinal y motora (29%). Por lo tanto, la organización de las células de acuerdo con su día de origen, indican que la corteza entorrinal es más vieja que las cortezas somatosensorial y motora. La corteza motora tiene una edad intermedia y la corteza somatosensorial es la más joven (Figura 3-A). Más interesante aún, es el hecho de que esta cronoarquitectura diferencial se correlaciona con el proceso neurodegenerativo asincrónico que ha sido descrito previamente (Braak et al., 2003a, 2003b).

Con base en análisis neuropatológicos realizados en tejido postmortem de pacientes con enfermedad de Parkinson y Alzheimer, Braak et al. (2003a, 2003b & 2006) identificaron patrones estereotipados de degeneración neuronal que se desarrollan secuencialmente en el SNC y periférico, y que son coincidentes con la gravedad clínica de la enfermedad. De acuerdo con la progresión de la misma, estos patrones se han clasificado en seis etapas. Hablando específicamente de la corteza cerebral, la degeneración neuronal comienza en la etapa 4 con la corteza entorrinal. En la etapa 6, el proceso patológico se extiende a la corteza motora y en raras ocasiones, se observa en la corteza somatosensorial (Figura 3-B). En resumen, la corteza entorrinal en la cual la patología neurodegenerativa ocurre antes, está conformada por células cronológicamente más viejas. Por el contrario, la corteza somatosensorial que rara vez sufre degeneración neuronal, está conformada preferentemente por células jóvenes.

Si consideramos que células viejas son más susceptibles a expresar el fenotipo senescente debido a la acumulación de daño en su DNA, aquellas cortezas configuradas por un número mayor de células viejas, senescerán antes que aquellas cortezas celularmente más jóvenes. Por lo tanto, hipotetizamos

que la corteza entorrinal tendrá una acumulación mayor de células senescentes con respecto a las cortezas motora y somatosensorial. En virtud de la evidencia que señala a la corteza somatosensorial como una región poco susceptible a daño por neurodegeneración, y a su conformación con un bajo porcentaje de células viejas, proponemos que esta región acumulará un número escaso de células en estado senescente (Figura 3-C). Llevado al proceso neurodegenerativo, este hecho podría explicar la sintomatología característica de las etapas iniciales e intermedias en ausencia de la muerte neuronal, y la progresión temporal de los procesos neurodegenerativos. Considerando lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue establecer si las neuronas de origen embrionario temprano expresan de manera anticipada el fenotipo senescente. De esta forma, el patrón asincrónico de neurodegeneración de la corteza cerebral, podría explicarse por la cronoarquitectura celular que se establece desde el periodo embrionario y hasta la adultez temprana.

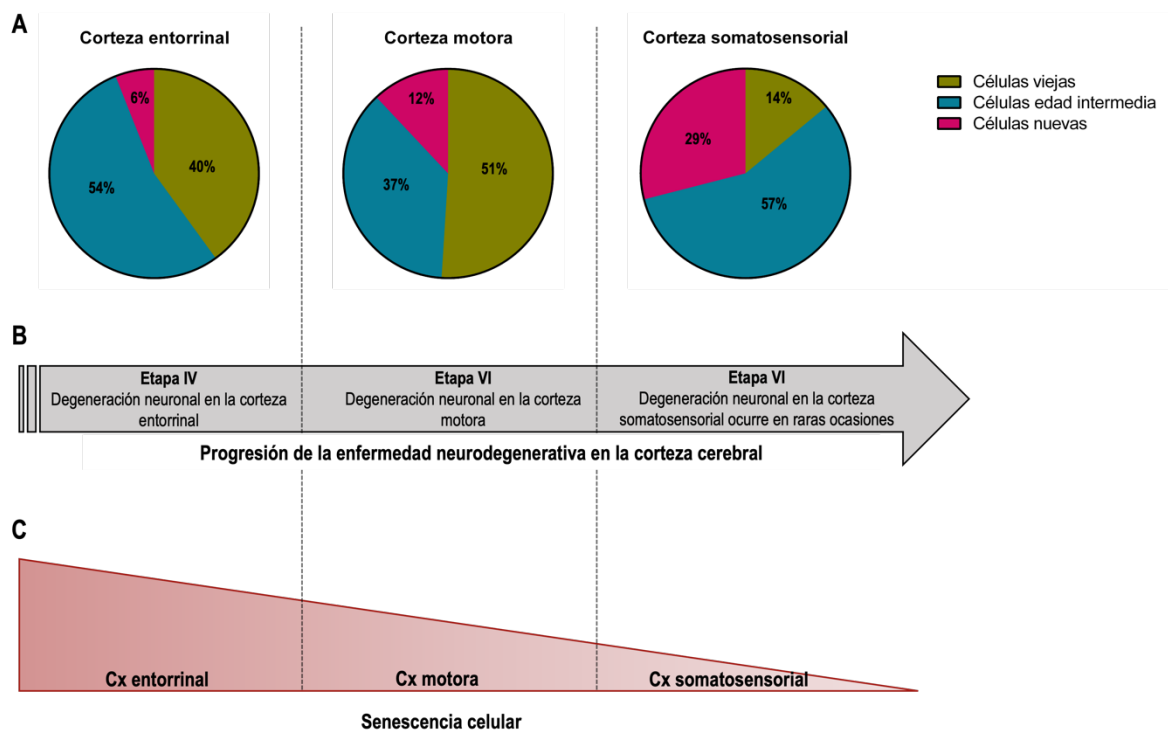


Figura 3. **A.** Gráficas de pastel que muestran el porcentaje de neuronas viejas, intermedias y nuevas (i.e., cronoarquitectura) en las cortezas entorrinal, motora y somatosensorial a los 60 días posnatales en rata. Realizada con datos de Bayer (1980) y Bayer & Altman (1991). **B.** Esquema de la línea de tiempo en la que se observa el orden de progresión del proceso neurodegenerativo en la corteza cerebral humana. **C.** Esquema de la línea de tiempo en la que se representa el modelo propuesto de la acumulación esperada de neuronas senescentes en las cortezas entorrinal, motora y somatosensorial de ratones adultos jóvenes.

5. HIPÓTESIS

Las regiones corticales más susceptibles a daño por degeneración están constituidas por células cronológicamente más viejas y acumulan un número mayor de células senescentes.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Establecer si las regiones corticales más susceptibles a daño por degeneración están constituidas por células cronológicamente más viejas y proclives a desarrollar fenotipos senescentes.

6.2. Objetivos específicos

1. Establecer la cronoarquitectura de las cortezas entorrinal, somatosensorial y motora, regiones cerebrales con diferente susceptibilidad a la neurodegeneración.
2. Establecer si las regiones cerebrales cronológicamente más viejas acumulan un número mayor de células senescentes.

7. METODOLOGÍA

7.1. Animales

Para el presente trabajo se manipularon 17 ratones de la cepa CD-1 (6 machos, 11 hembras) con edad embrionaria de 11, 12, 13 y 14 días al inicio del experimento. Los ratones provinieron de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Al nacimiento, los ratones fueron mantenidos con su madre, hasta el destete en el día posnatal 21. Una vez destetados, los animales se dividieron de acuerdo con el sexo, y se alojaron en cajas de policarbonato transparente (37x27x15cm) de manera comunal (5 ratones por caja), con un ciclo luz- oscuridad 12-12 horas. Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum*. La manipulación experimental y los procedimientos de eutanasia fueron evaluados por la Comisión de Ética para el uso y manejo de Animales de Experimentación del IIB, UNAM.

7.2. Administración de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)

Con el objetivo de fechar el nacimiento de las neuronas que integrarían a las cortezas motoras, somatosensorial y entorrinal de 17 ratones adultos marcados durante la gestación, se suministró vía intraperitoneal BrdU (50mg/Kg) a cuatro hembras gestantes, tres veces al día, cada ocho horas, entre los días gestacionales 11 y 14; etapas en las que la neurogénesis cortical está activa. Debido a que cada hembra gestante fue administrada en un solo día, originamos cuatro grupos de edad (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos de animales empleados en el diseño experimental, divididos de acuerdo con el día de administración de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU).

Grupo	Administración BrdU	Hembras	Machos
Grupo 1 (n=4)	E11	2	2
Grupo 2 (n=3)	E12	3	0
Grupo 3 (n=5)	E13	3	2
Grupo 4 (n=5)	E14	3	2

7.3. Tejido cerebral

Los ratones se sacrificaron por perfusión intracardiaca a los 60 días posnatales (dpm). Los cerebros fueron fijados con paraformaldehído 4%, deshidratados en pasos sucesivos de sacarosa al 20% y 30%, congelados con 2-metilbutano, y almacenados a -80°C. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de los cerebros en criostato a -20°C a un grosor de 40 µm. En total, fueron seleccionados 36 cortes por animal en los cuales se representaba la totalidad de las áreas de interés. Cortes contiguos se emplearon para realizar la inmunohistoquímica BrdU y la histoquímica SA-β-gal. Para cada animal 18 cortes se utilizaron para la inmunohistoquímica contra BrdU, y 18 cortes para la tinción SA-β-gal.

7.4. Inmunohistoquímica BrdU

Para analizar el destino y la organización celular de las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora, cortes coronales de cerebro fueron procesados por medio de inmunohistoquímica contra BrdU. La inmunohistoquímica se realizó con ayuda del protocolo de peroxidasa. Brevemente, después de la eliminación de la actividad de la peroxidasa endógena mediante la incubación con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos, los cortes se mantuvieron durante 30 minutos a 70°C en inmunoretriever 1x (Bio SB, Cat. No. BSB 0020). Posteriormente, los cortes se trataron con HCl 2N a 37°C durante 30 minutos. Los cortes se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales inmunoafines a BrdU (Oveja anti-BrdU, Abcam. Cat. No. ab1893). El anticuerpo primario se utilizó a una concentración 1:600 disuelto en suero de caballo al 5% y PBT (Tritón X-100, 0.3%). Al día siguiente, los cortes se conservaron durante 2 horas en anticuerpo secundario biotinilado (Burro anti-oveja biotinilado, Millipore. Cat. No. AP184B), a una concentración de 1:750 en suero de caballo al 5% y PB. Se utilizó tetrahidrocloreto de 3-3 diaminobencidina (DAB) como cromógeno (Vector, Cat. No. SK-4100). Finalmente, los cortes se colocaron en portaobjetos, y se empleó cytooseal 60 (Thermo Scientific, Cat. No. 8310-4) como medio de montaje.

7.5. Histoquímica para β - galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal)

La actividad de la SA- β -gal se analizó siguiendo el protocolo descrito por Debacq-Chainiaux et al. (2009). Las rebanadas de cerebro se lavaron con PB y se tiñeron con una solución que contenía los siguientes reactivos: 1 mg/ml x-gal (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Cat. No. B1690) disuelto en dimetilformamida, amortiguador ácido cítrico/fosfato de sodio 40 mM (pH 6.0), ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, cloruro de sodio 150 mM y cloruro de magnesio 2 mM. Los cortes se incubaron durante 16 horas a 37°C sin CO₂. Pasado este tiempo las rebanadas fueron lavadas con PB y se incubaron durante 2 horas en metanol. Por último, los cortes se colocaron en portaobjetos y se empleó un medio de montaje acuoso (VectaMount Aqueous Mounting Medium, Vector. Cat. No. H-5501).

El diseño experimental se resume en la figura 4-A.

7.6. Análisis de fotografías

Las fotografías de los cortes procesados para inmunohistoquímica contra BrdU se realizaron en un microscopio LEICA EZ4E. Por su parte, las fotografías de los cortes marcados con SA- β -gal fueron capturadas con dos microscopios. En 7 sujetos, las fotografías se adquirieron con un microscopio Leica EZ4E. En los 10 sujetos restantes se empleó un microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU). La reconstrucción del tejido completo se realizó a una magnificación de 10x. Aproximadamente 300 cortes marcados con anticuerpo BrdU, y 300 cortes marcados para SA- β -gal fueron fotografiados para realizar la evaluación cualitativa posterior de las imágenes. En promedio se evaluaron 9 cortes por sujeto para cada una de las regiones de interés. Los cortes se encontraban en las siguientes coordenadas: corteza entorrinal Bregma: [-1.31mm, -3.63mm]; corteza motora Bregma: [2.09mm, -1.31mm]; corteza somatosensorial Bregma: [1.53mm, -1.31mm] (Franklin & Paxinos, 2007). En la figura 4-B se muestra un esquema representativo de la ubicación de las regiones analizadas.

La evaluación realizada tuvo como objetivo comparar la distribución espacial de las células marcadas con BrdU a distintas edades gestacionales, con aquella de las células marcadas para SA- β -gal en las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora a los 60 dpn.

La evaluación cualitativa de ambas marcas se realizó considerando la distribución y densidad espacial de las células en cada una de las regiones corticales evaluadas. Dentro de la escala, las regiones con mayor densidad celular fueron aquellas en las que las células se distribuyeron de manera homogénea y prominente por toda la región. Las regiones consideradas con una menor densidad celular, fueron aquellas en las que la localización de las células marcadas fue muy específica y/o cuando se observaban esporádicamente dentro de las áreas evaluadas.

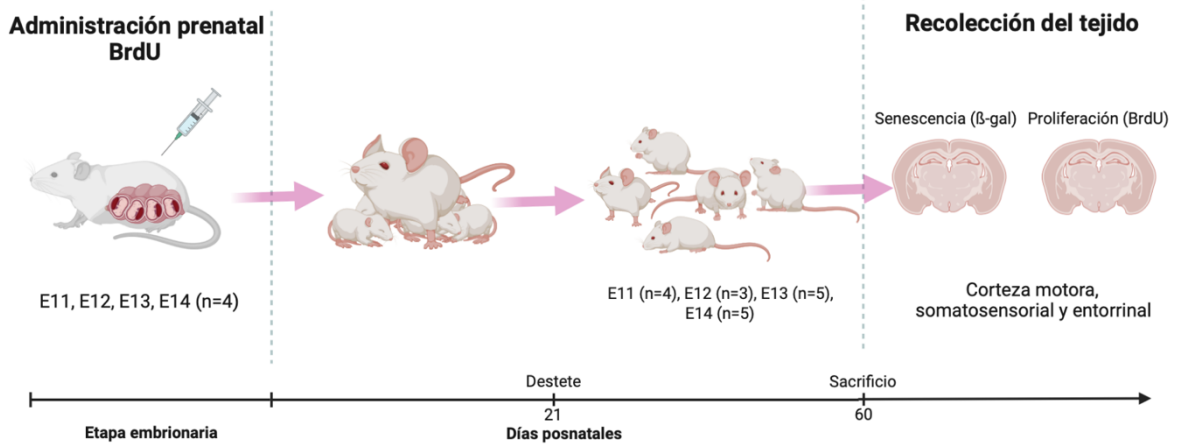


Figura 4-A. Diseño experimental. La 5-bromo-2'- desoxiuridina (BrdU) fue administrada perinatalmente durante los días embrionarios 11, 12, 13 ó 14 para fechar el día de nacimiento de los distintos grupos de neuronas que conforman a las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora. Una vez nacidos los animales, fueron destetados a los 21 días de vida, y dejados crecer hasta los 60 días postnatales. La caracterización del fenotipo senescente se realizó mediante la detección de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal). Figura realizada en biorender.com.

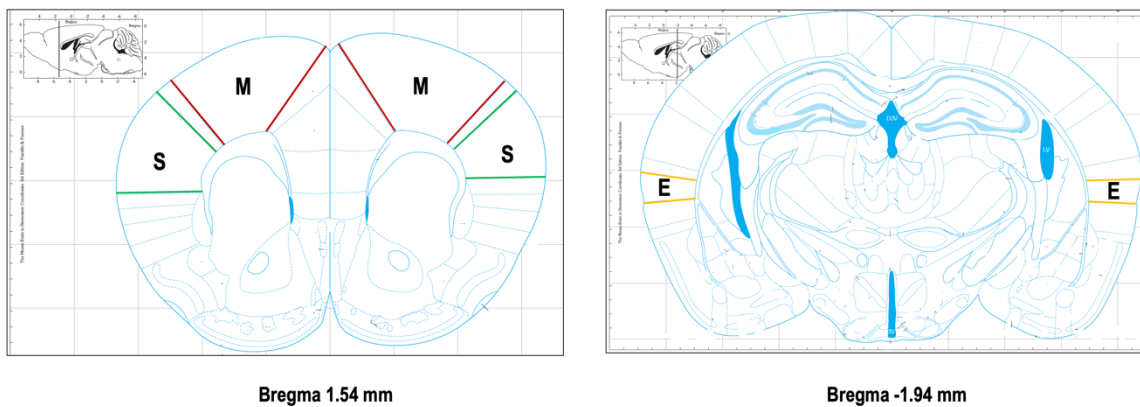


Figura 4-B. Esquema representativo de la ubicación de las cortezas motora (M, rojo), somatosensorial (S, verde) y entorrinal (E, amarillo). Modificada de Franklin & Paxinos, 2007.

8. RESULTADOS

8.1. Cronoarquitectura de la corteza entorrinal

Mediante el uso de un marcador de proliferación celular, establecimos el destino de las células nacidas entre los días embrionarios 11 y 14. Esta metodología, nos permitió inferir la edad cronológica de cada una de las áreas corticales de interés, de acuerdo con su organización celular.

Como se puede observar en la figura 5, la corteza entorrinal a los 60 días posnatales está constituida por un número importante de células nacidas en el día embrionario 11 (Bregma: [-1.31, -2.69mm]). El análisis reveló que en el 100% de los cortes, las células se distribuyen de forma abundante por las capas II-VI. Sin embargo, pueden enfatizarse tres patrones. En el 21% de los cortes, la inmunotinción para BrdU se distribuye homogéneamente a lo largo de las capas II-VI. Este patrón se observa únicamente en los cortes correspondientes a la porción anterior de la corteza entorrinal (Fig. 5A). En el 58% de los cortes la inmunotinción para BrdU está acentuada en la capa VI, indicando un mayor número de células. Este patrón se localiza principalmente en la porción medial-posterior (Fig. 5A). El 21% restante presenta células positivas a BrdU acentuadas en la capa II. Es de importancia señalar que este porcentaje representa la totalidad de cortes analizados en uno de los sujetos (Fig. 5B). Por esta razón, este patrón abarca a la porción anteroposterior de la corteza entorrinal. Diferencias en el plano ventral-dorsal fueron observadas en 2 de 4 sujetos analizados. Sin embargo, parece que estas diferencias son consecuencia del procesamiento de las muestras.

La evaluación de las células originadas en el día E12 (Bregma: [-1.31, -2.69mm]), mostró la existencia de dos patrones principales. El 100% de los cortes muestra una inmunotinción para BrdU homogénea en el plano ventral-dorsal, distribuida a lo largo de las capas II-VI. Este patrón corresponde a la parte anterior de la corteza entorrinal. En un 50% del total de los cortes evaluados se observó una densidad celular mayor en la capa VI, con respecto a las capas II-V. Este patrón es característico de la porción medial-posterior de la corteza entorrinal (Fig. 5C).

Por lo que respecta a las células que se originaron en el día E13 (Bregma: [-1.31, -3.63mm]), el 100% de los cortes muestran células positivas a BrdU en las capas II-VI, sin diferencias en el plano ventral-dorsal. Sin embargo, en el 26% de los cortes, la mayor parte de las células se ubicaron en la capa II. Las células localizadas en las capas III-VI se distribuyeron de forma difusa. Este patrón se observó en 2 de los 5 sujetos analizados, y corresponde a la porción anterior de la corteza entorrinal. En el 74% de cortes restantes, las células positivas a BrdU se ubican preferentemente en las capas II y III. Las células localizadas en las capas IV-VI son pocas y muestran una distribución dispersa. Este patrón abarca la región anteroposterior de la corteza entorrinal (Fig. 5D).

Finalmente, en el 100% de los cortes analizados para las células originadas en el día E14 (Bregma: [-1.31, -3.15mm]) se observó una distribución homogénea de las células positivas a BrdU en el plano ventral-dorsal. Las células que nacieron en el día E14 se ubican mayoritariamente en la capa II. Esporádicamente se localizan células en el resto de las capas. Este patrón se identifica en la porción anteroposterior de la corteza entorrinal (Fig. 5E).

Si consideramos el destino de las células que se originan entre el día E11-E14, podemos concluir que a los 60 días posnatales, la corteza entorrinal está constituida principalmente por células nacidas entre los días embrionarios 11 y 12. El gradiente neurogénico radial, reportado previamente en la literatura (Bayer & Altaman, 1991), sugiere que las neuronas más profundas (capa VI), se originan antes que las células superficiales (capa II) cercanas a la capa I. Nuestros resultados indican que en el día embrionario 11 y 12 un porcentaje $\geq 50\%$ de los cortes sigue este gradiente neurogénico, evidenciado por la presencia de un mayor número de células ubicadas en la capa VI (Fig. 5A, C). Sin embargo, existen dos gradientes adicionales. En el primero de ellos, uno de los sujetos analizados para el día E11 muestra un patrón inverso, con un mayor número de células en la capa II (Fig. 5B). En el segundo, se observa una distribución homogénea a lo largo de las capas. Los cortes analizados para E13 y E14 están en concordancia con el gradiente radial, conforme avanza el desarrollo el patrón se invierte y las células se observan acentuadas ahora, en las capas externas II y III, y disminuyen en el resto de las capas (Fig. 5D, E). Las células nacidas el día E13 son escasas en la capa IV-VI, y para el día E14 las células son prácticamente inexistentes en estas mismas capas, contrario a lo observado en el día embrionario 11 y 12.

En las figuras 6 y 7, se observan cortes representativos con células positivas a BrDU en la corteza entorrinal, de animales de 60 días de edad, administrados en los días embrionarios 11 a 14.

Corteza entorrinal 60 días posnatales

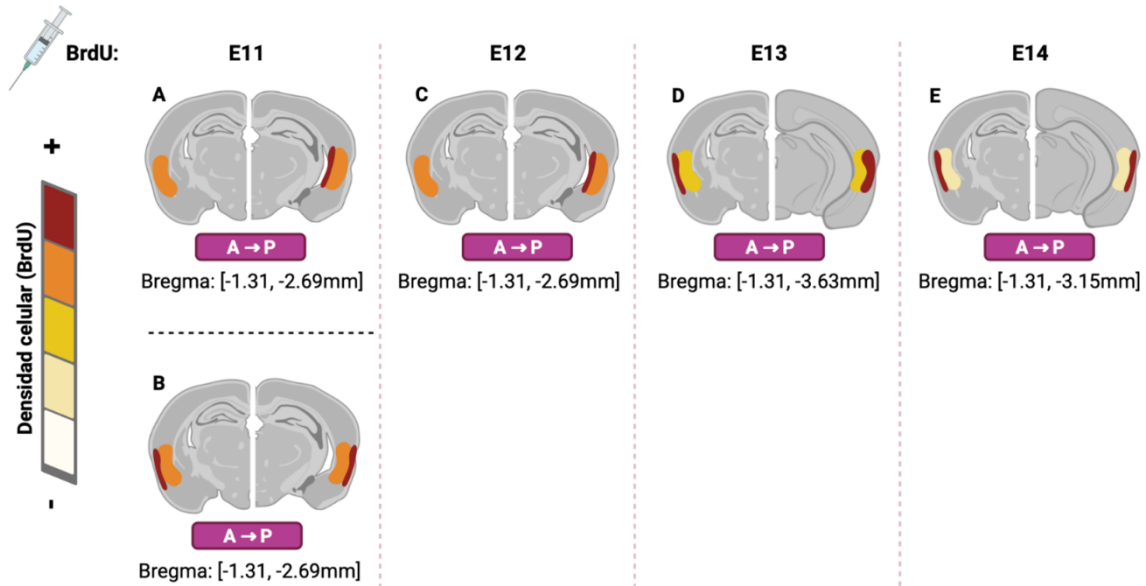


Figura 5. La corteza entorrinal está poblada por neuronas que nacen mayoritariamente entre los días gestacionales 11 y 12. Esquemas que ilustran cortes coronales representativos de la cronoarquitectura de la corteza entorrinal en ratones de 60 días de vida, después de haber captado 5'-bromo-deoxiuridina a los 11 (A y B), 12 (C), 13 (D) y 14 (E) días de gestación. En cada esquema se muestra el nivel anterior a la izquierda y el posterior a la derecha. La escala de color indica la densidad relativa estimada cualitativamente de las células marcadas con BrdU; blanco menor densidad (-), rojo mayor densidad (+). Se indican las coordenadas entre las cuales se obtuvieron los cortes a lo largo del plano anteroposterior (A→P) con referencia a Bregma. Figura realizada en biorender.com.

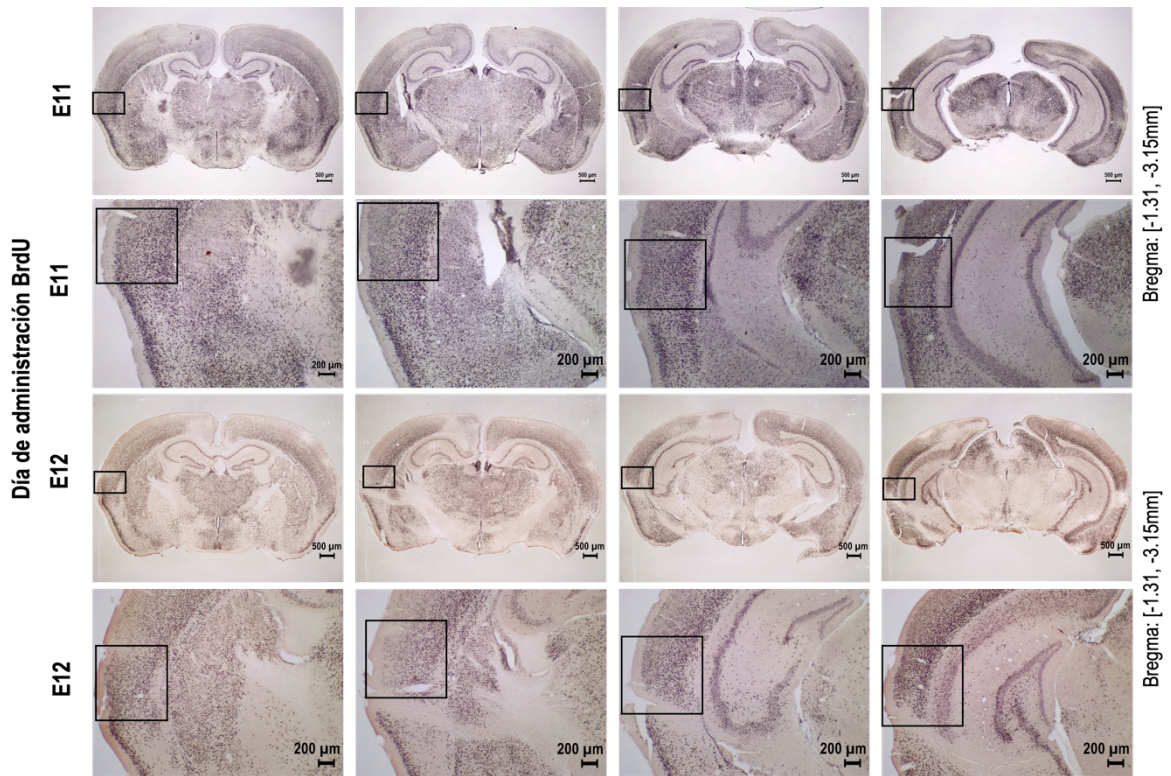


Figura 6. Corteza entorrinal a los 60 días posnatales. Fotomicrografías de cortes coronales representativos inmunoteñidos para 5-bromo-2'-desoxiuridina, obtenidos a lo largo de la corteza entorrinal (recuadro) de ratones de 60 días de vida. A la izquierda se indican las edades gestacionales en la que sus células fueron marcadas.

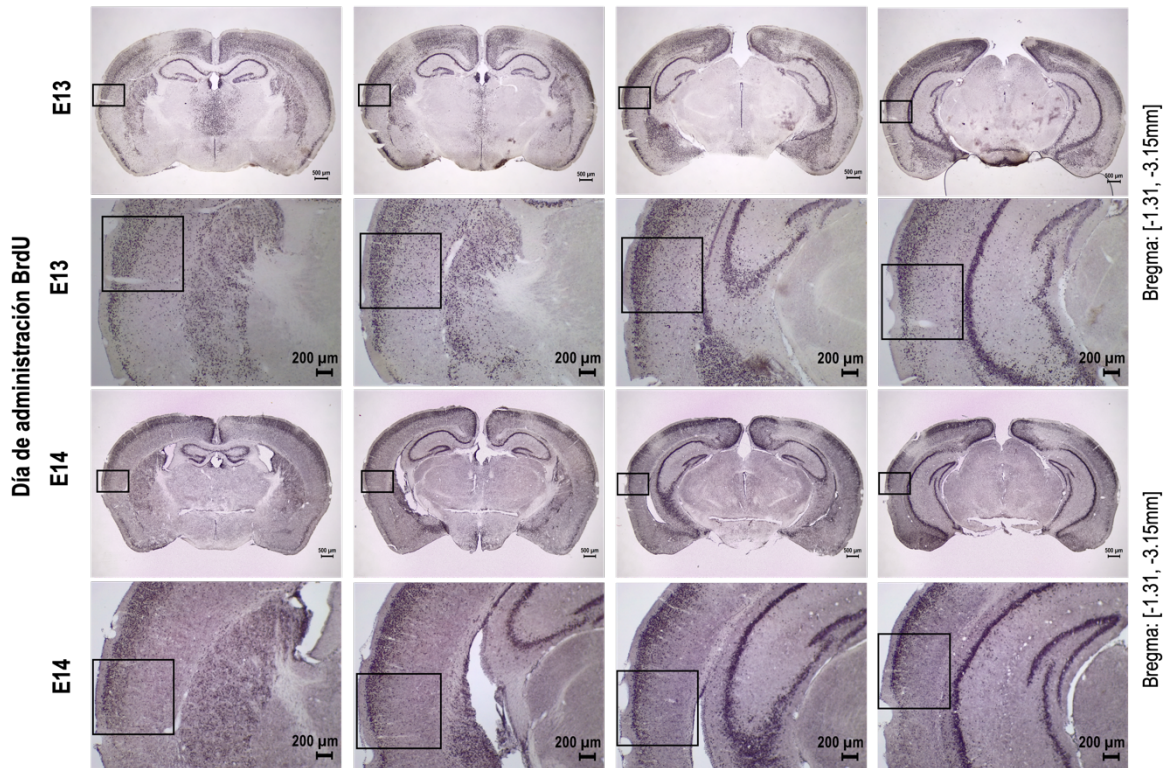


Figura 7. Corteza entorrinal a los 60 días posnatales. Fotomicrografías de cortes coronales representativos inmunoteñidos para 5-bromo-2'-desoxiuridina, obtenidos a lo largo de la corteza entorrinal (recuadro) de ratones de 60 días de vida. A la izquierda se indican las edades gestacionales en las que sus células fueron marcadas.

8.2. Cronoarquitectura de la corteza motora

Por su parte, en el 100% de los cortes evaluados para describir la cronoarquitectura de la corteza motora a los 60 dpn, indican que las células de origen embrionario 11 (Bregma: [1.77, -1.31mm]) se distribuyen a lo largo de las capas II-VI. Sin embargo, pueden distinguirse dos patrones. En el primero de ellos la inmunotinción para BrdU está acentuada en la parte más profunda de la capa VI (VI-b). En el resto de las capas las células positivas a BrdU son escasas, especialmente en las capas II y III (Fig. 8A). Este patrón corresponde al 50% de los cortes analizados, está presente únicamente en 2 de 4 sujetos, y es observable a lo largo del plano anteroposterior. El segundo patrón se observa en los dos sujetos restantes y corresponde al otro 50% de los cortes analizados. En éstos la inmunotinción para BrdU está acentuada en la región a y b de la capa VI. En el resto de las capas se observa un patrón de marca abundante y homogénea en el plano anteroposterior (Fig. 8B).

La evaluación para las células nacidas en el día E12 (Brega: [1.77, -1.31mm]) mostró que, en el 100% de los cortes, las células positivas para BrdU se distribuyen en las capas II-VI. Sin embargo, en las capas II y III son escasas. En el 30% de estos cortes, la inmunotinción para BrdU que se distribuye entre las capas IV y VI, es homogénea y abundante. Este patrón se localiza en la porción anterior de la corteza motora (Fig. 8C). En el 70% restante, las células se ubicaron primordialmente en la región

a y b de la capa VI. En las capas IV y V se observan escasas células marcadas. Este patrón se ubica en porciones anteroposteriores de la corteza motora (Fig. 8D).

En lo concerniente a las células de origen embrionario 13 (Bregma: [1.93, -1.31mm]), en el 80% de los cortes analizados, las células positivas a BrdU presentan un patrón de distribución homogéneo y abundante entre las capas II-VI. Este patrón se extiende a lo largo de plano anteroposterior de la corteza motora (Fig. 8E). El 20% restante, muestra un patrón de distribución muy disperso a lo largo de las capas II-VI, que se extiende en el plano anteroposterior (Fig. 8F). No obstante, en este segundo bloque de cortes la inmunotinción para BrdU fue irregular quizás debido a factores técnicos, por lo que la descripción comentada requerirá de ser corroborada posteriormente.

En el 100% de los cortes analizados para el día de nacimiento E14 (Bregma: [1.77, -1.31mm]), las células se localizaron primordialmente en las capas II y III. En el 82% de los cortes las células ocupaban la totalidad de la capa II, y aproximadamente el 50% de la capa III. En el 18% restante las células positivas a BrdU ocupaban cerca del 100% de la capa III. Para ambos patrones, lo que resta de la capa III y en la capa IV-VI, las células se observan de forma esporádica. Las células que se ubican en la capa II y III son abundantes (Fig. 8G).

Finalmente, podemos concluir que las células que integran la corteza motora a los 60 días posnatales siguen un gradiente neurogénico radial. Las células que nacieron en los días 11 y 12 de gestación ocupan preferencialmente la capa VI (Fig. 8A, B y D). Las células de origen embrionario 13 se distribuyen homogéneamente por toda la corteza motora (Fig. 8E), y para el día E14 se observa un patrón invertido con respecto a los días E11 y E12, con el mayor número de células ubicadas en las capas más externas (Fig. 8G). Esto significa, que las células de la capa VI son las primeras en formarse seguidas de las capas intermedias V y IV. Por último, se forman las capas externas II y III. Sin embargo, aunque los cortes analizados siguen el gradiente radial, es de relevancia destacar que, entre individuos de la misma edad, las células se organizan diferencialmente. Por ejemplo, un gradiente casi idéntico se observa para el 50% de los cortes cuyas neuronas fueron marcadas en el día gestacional E11 (Fig. 8A), y para 70% de aquellos cuyas células fueron marcadas en el día gestacional E12 (Fig. 8D). Este hecho, enfatiza la variabilidad en la tasa de desarrollo en individuos de la misma edad. Aunque la corteza motora contiene neuronas nacidas en los días gestacionales E11 y E14, la mayor cantidad de neuronas que la ocupan nacen entre los días embrionarios 12 y 13. Esto significa que la corteza motora es relativamente más joven que la corteza entorrinal.

Corteza motora 60 días posnatales

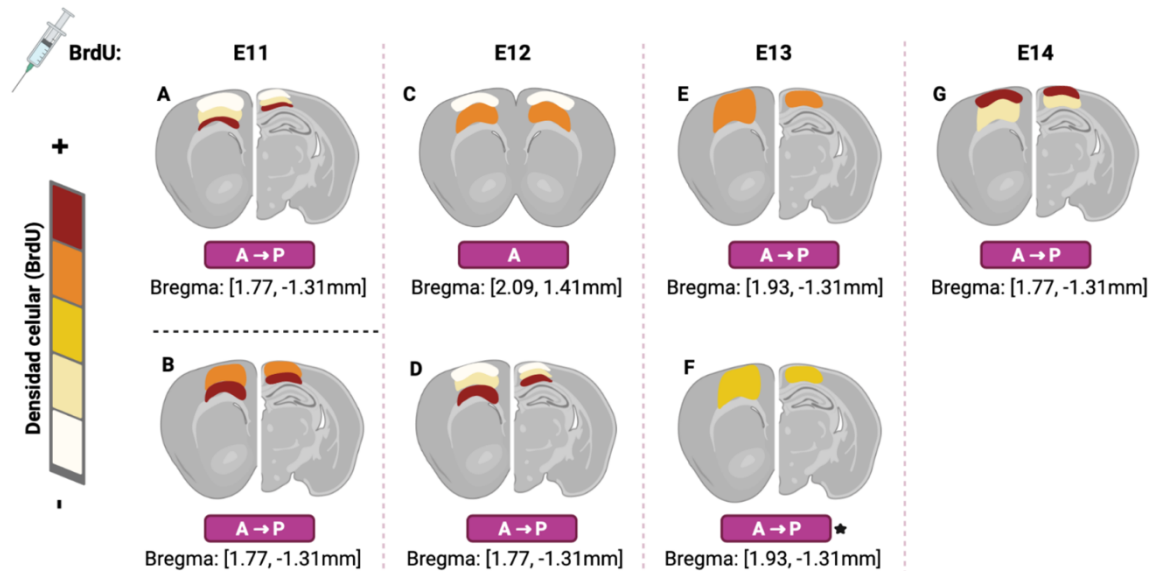


Figura 8. La corteza motora está poblada por neuronas que nacen mayoritariamente entre los días gestacionales 12 y 13. Esquemas que ilustran cortes coronales representativos de la cronarquitectura de la corteza motora en ratones de 60 días de vida, después de haber captado 5-bromo-2'-desoxiuridina a los 11 (A y B), 12 (C y D), 13 (E y F) y 14 (G) días de gestación. En cada esquema se muestra el nivel anterior a la izquierda y el posterior a la derecha. La escala de color indica la densidad relativa estimada cualitativamente de las células marcadas con BrdU; blanco menor densidad (-), rojo mayor densidad (+). Se indican las coordenadas entre las cuales se obtuvieron los cortes a lo largo del plano anteroposterior (A→P) con referencia a Bregma. Figura realizada en biorender.com.

8.3. Cronarquitectura de la corteza somatosensorial

En el 100% de los cortes analizados para el día E11 (Bregma: [1.53, -1.31mm]), las células positivas a BrdU se distribuyen a lo largo de las capas II-VI. En el 55% de estos cortes la ubicación de las células está acentuada en la región b de la capa VI. La tinción celular disminuye progresivamente conforme se avanza hacia las capas más superficiales (Fig. 9A). En el 45% restante de los cortes la inmunotinción para BrdU se observa acentuada en la región a y b de la capa VI. Sin embargo, en el resto de las capas la marca es abundante y homogénea (Fig. 9B). Ambos patrones se distribuyen a lo largo de plano anteroposterior de la corteza somatosensorial.

El 100% de los cortes analizados para células de origen embrionario 12 (Bregma: [1.53, -1.31mm]) mostró una distribución de las células positivas a BrdU a lo largo de las capas II-VI. En el 46% de los cortes las células están abundante y homogéneamente distribuidas entre las capas IV-VI. En la capa II y III, las células son escasas (Fig. 9C). En el 54% restante de los cortes la marca de BrdU está acentuada en la capa VI (a y b); en el resto de las capas la marca es dispersa. Las células son escasas en la capa II y III (Fig. 9D). Ambos patrones se distribuyen a lo largo de la porción anteroposterior de la corteza somatosensorial.

En lo que respecta a las células nacidas en el día embrionario 13 (Bregma: [1.53, -1.31mm]) el análisis reveló que en el 100% de los cortes las células se localizan de manera abundante en la capa II, y en

aproximadamente el 50% del área de la capa III. En lo que resta de la capa III, y en las capas IV-VI la marca es escasa. El patrón se repite a lo largo del plano anteroposterior de la corteza somatosensorial (Fig. 9E).

Finalmente, el 100% de los cortes analizados para las células nacidas en el día E14 (Bregma: [1.41, -1.31mm]) mostró que las células se localizan casi exclusivamente en la capa II y III (aproximadamente el 50% de la porción dorsal). Son escasas las células marcadas en las capas III y IV, y virtualmente ausentes en las capas V y VI (Fig. 9F).

En las figuras 10 y 11 se observan cortes representativos con células positivas a BrDU en las cortezas somatosensorial y motora de animales de 60 días de edad, administrados en los días embrionarios 11 a 14.

En conclusión, en la corteza somatosensorial, las células que nacen el día E11 se posicionan en la capa VI (Fig. 8A, B). Las nacidas en E12 y E13 se ubican preferentemente entre las capas VI- IV (Fig. 9C-E). Para el día E14 se observa un mayor número de células en las capas más externas (Fig. 9F). En conjunto, nuestro análisis sugiere que la corteza somatosensorial sigue un gradiente neurogénico radial, en el que las células ubicadas en la parte más profunda se originan primero y aquellas en las capas más externas se originan al final. Al igual que lo observado en las cortezas entorrinal y motora, se observa una tasa de desarrollo y organización variable entre individuos de la misma edad. Esto se evidencia principalmente al observar que el 46% de los cortes correspondientes al día E12 tienen un patrón de organización casi idénticos. Así, los datos presentados muestran que las cortezas somatosensorial y motora tienen una edad relativa cronológica similar. Por ello consideramos que la corteza entorrinal está constituida por un mayor número de células nacidas en el día embrionario 11 y 12, mientras que las cortezas somatosensorial y motora están contienen neuronas que nacen entre los días 13 y 14, predominantemente.

Corteza somatosensorial 60 días posnatales

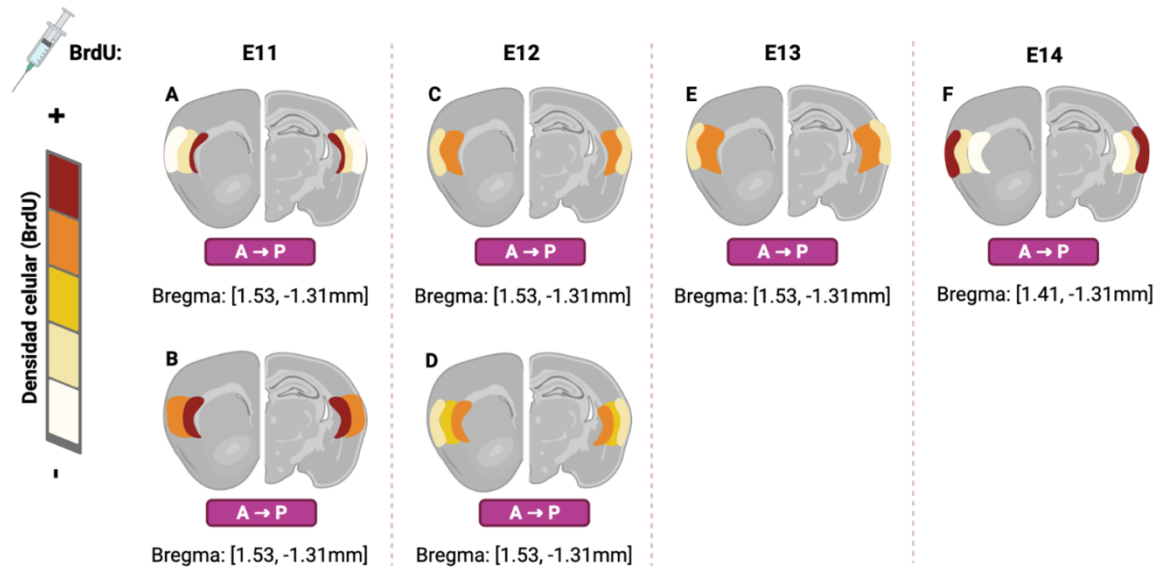


Figura 9. La corteza somatosensorial está poblada por neuronas que nacen mayoritariamente entre los días gestacionales 12 y 13. Esquemas que ilustran cortes coronales representativos de la cronoarquitectura de la corteza somatosensorial en ratones de 60 días de vida, después de haber captado 5-bromo-2'-desoxiuridina a los 11 (A y B), 12 (C y D), 13 (E) y 14 (F) días de gestación. En cada esquema se muestra el nivel anterior a la izquierda y el posterior a la derecha. La escala de color indica la densidad relativa, estimada cualitativamente de las células marcadas con BrdU; blanco menor densidad (-), rojo mayor densidad (+). Se indican las coordenadas entre las cuales se obtuvieron los cortes a lo largo del plano anteroposterior (A→P) con referencia a Bregma. Figura realizada en biorender.com.

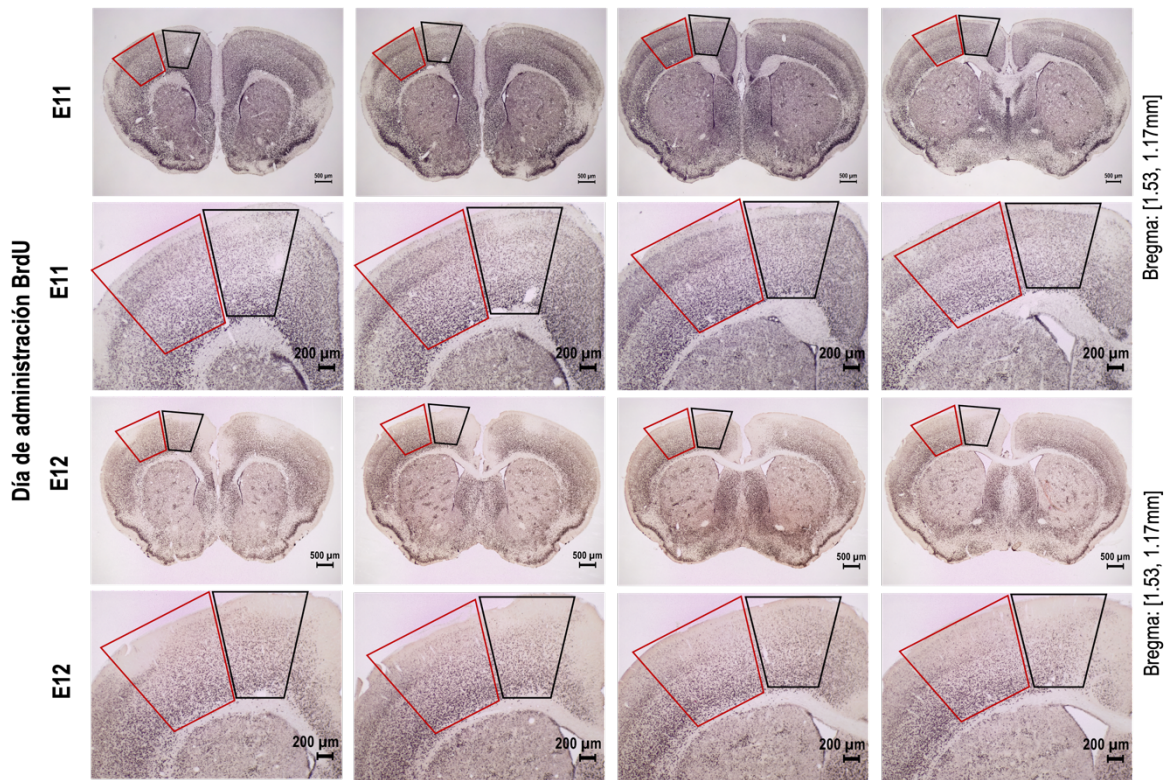


Figura 10. Cortezas motora y somatosensorial a los 60 días posnatales. Fotomicrografías de cortes coronales representativos inmunoteñidos para 5-bromo-2'-desoxiuridina, obtenidos a lo largo de las cortezas motora (recuadro negro) y somatosensorial (recuadro rojo) de ratones de 60 días de vida. A la izquierda se indican las edades gestacionales en las que sus células fueron marcadas.

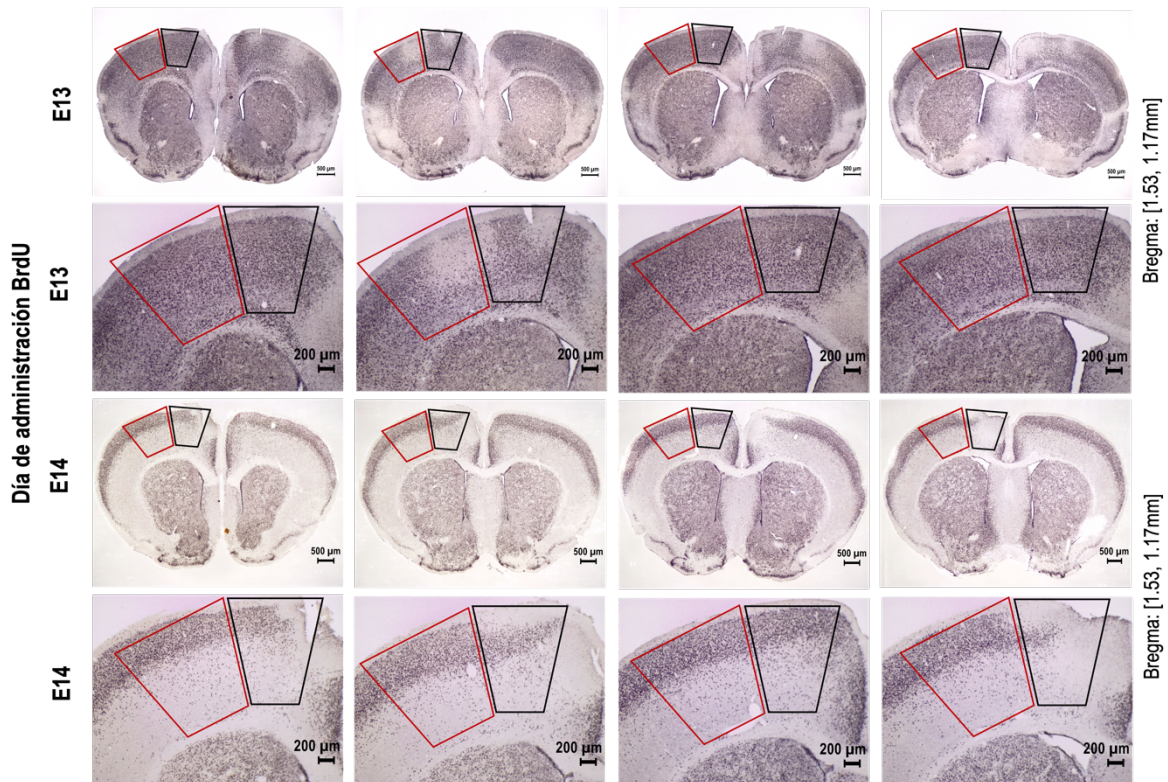


Figura 11. Cortezas motora y somatosensorial a los 60 días posnatales. Fotomicrografías de cortes coronales representativos inmunoteñidos para 5-bromo-2'-desoxiuridina, obtenidos a lo largo de las cortezas motora (recuadro negro) y somatosensorial (recuadro rojo) de ratones de 60 días de vida. A la izquierda se indican las edades gestacionales en las que sus células fueron marcadas.

8.4. Heterocronía de la senescencia celular en el cerebro

Con el objetivo de evaluar si la corteza entorrinal acumula un mayor número de células senescentes al ser comparada con las cortezas somatosensorial y motora, se realizó una evaluación cualitativa de la cantidad relativa de células positivas para SA- β -gal. En general, todos los ratones evaluados mostraron células senescentes en diversas áreas del cerebro. La cantidad relativa de éstas varió regional e individualmente, independientemente de la edad gestacional en la que fueron marcados con BrdU (Tabla 3). Esta observación sugiere que la senescencia ocurre de manera heterocrónica en el individuo, y a través de la población. No se observó una relación espacial entre neuronas nacidas en distintas fechas gestacionales y la acumulación de células senescentes, por lo que no se corroboró la hipótesis planteada. Con base en la edad gestacional y el patrón de distribución anatómica de las células senescentes en los cerebros, los 17 ratones evaluados fueron clasificados en cuatro "fenotipos senescentes" (Fig.12), los que se describen en los párrafos subsecuentes.

Tabla 3. Número y sexo de los “fenotipos senescentes” identificados entre los ratones marcados con BrdU a diferentes edades gestacionales.

Día de administración BrdU	Fenotipo 1 (n=3)	Fenotipo 2 (n=6)	Fenotipo 3 (n=6)	Fenotipo 4 (n=2)
E11	1 ♀	-	2 ♀	1 ♂
E12	2 ♂	1 ♀	-	-
E13	-	1 ♀	2 ♀, 2 ♂	-
E14	-	2 ♀, 2 ♂	-	1 ♀

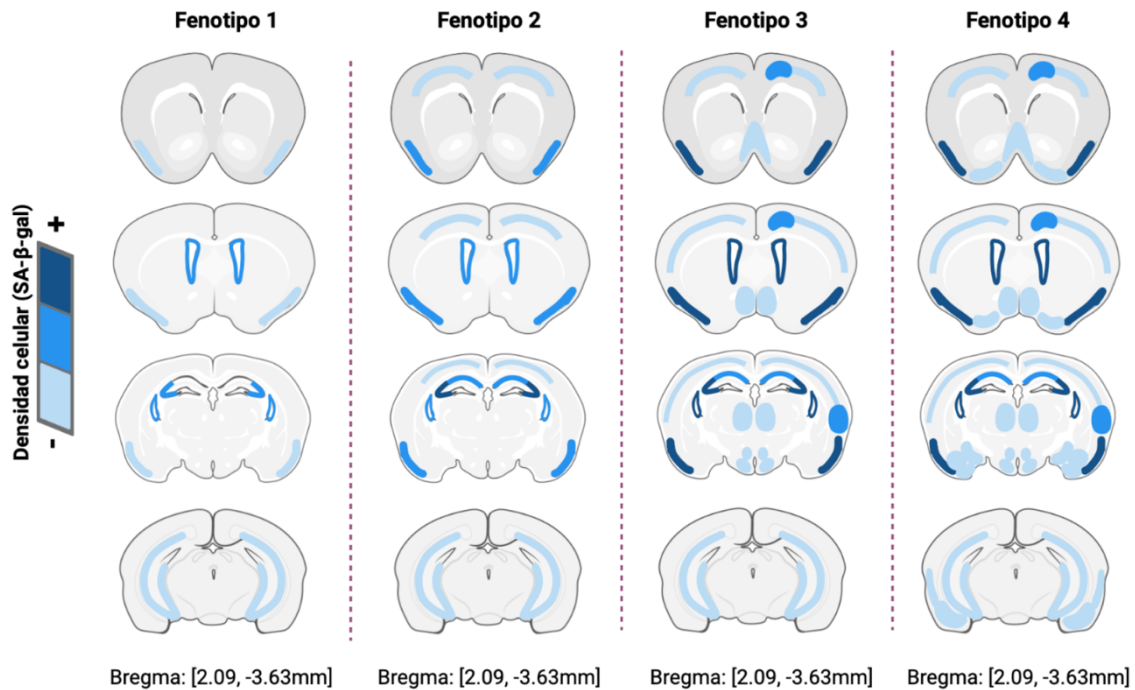


Figura 12. Fenotipos senescentes en ratones. Esquemas que ilustran cortes coronales representativos de la distribución de células senescentes en ratones, a los 60 días de vida. Fenotipo 1 (A-D), fenotipo 2 (E-H), fenotipo 3 (I-L) y fenotipo 4 (M-P). La escala de color indica la densidad relativa de las células positivas para SA-β-gal, estimada cualitativamente; azul claro menor densidad (-), azul rey mayor densidad (+). Se indican las coordenadas entre las cuales se obtuvieron los cortes a lo largo del plano anteroposterior con referencia a Bregma. Figura realizada en biorender.com.

8.4.1. Fenotipo senescente 1

Este fenotipo se caracteriza por la ausencia de células senescentes en las cortezas entorrinal, somatosensorial y motora (Fig.13), con la salvedad de algunos cortes obtenidos en las secuencias de las dos últimas. En el hipocampo, las células positivas a SA- β -gal se acentúa preferentemente en la región CA3 (Fig.13F-L). En dos de los sujetos, la marca es visible también en las regiones CA1 y CA2, aunque esta última es más tenue. Hacia la parte posterior del hipocampo (Bregma -2.69mm), aunque numerosas células se observan marcadas, la intensidad del marcaje es tenue. La intensidad de la marca en la pared de los ventrículos laterales es intermedia, y se extiende desde Bregma 0.25mm (Fig.13E) hasta el final de estas cavidades. Finalmente, la marca observada en la corteza piriforme es baja intensa (Fig.13E-J).

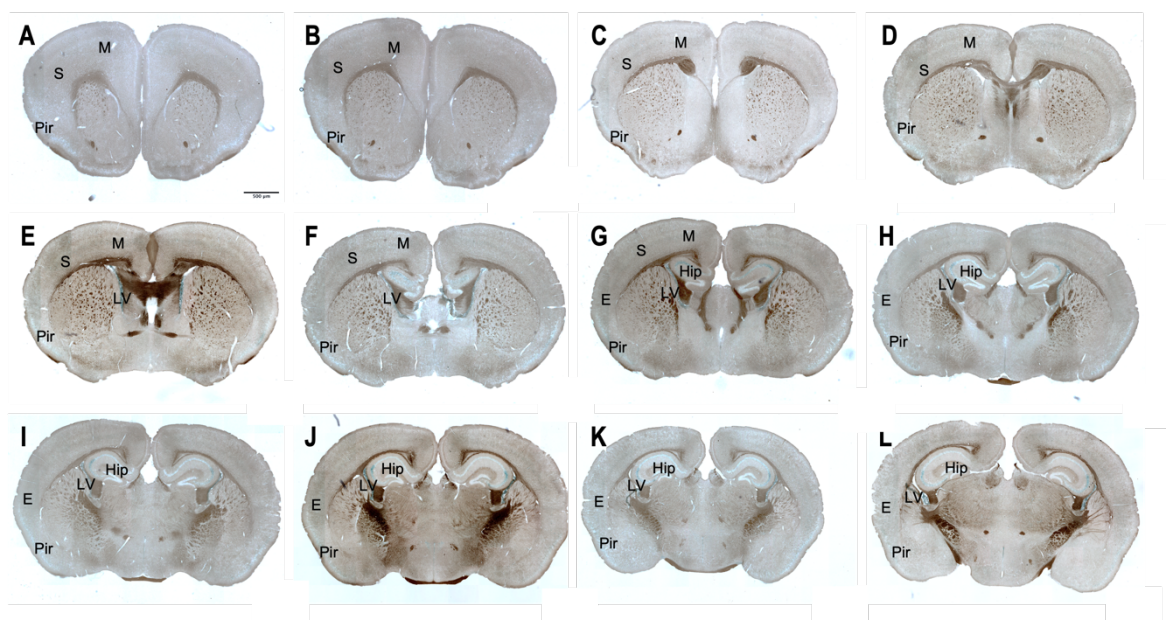


Figura 13. Fenotipo senescente 1. Cortes coronales representativos del telencéfalo de ratones que muestran la distribución anatómica de las células senescentes a lo largo del eje anteroposterior en el fenotipo 1. Se muestran las cortezas motora (M), somatosensorial (S), entorrinal (E), y piriforme (Pir), así como el hipocampo (Hip) y la pared de los ventrículos laterales (LV).

8.4.2. Fenotipo senescente 2

En este fenotipo la marca de senescencia en las cortezas somatosensorial y motora es tenue y poco abundante; en la mayoría de los cortes analizados las células se alinean horizontalmente en la capa V (Fig.14A-H). A lo largo del eje anteroposterior, la presencia de la marca es intermitente. La presencia de la marca en la corteza entorrinal es menos frecuente al ser comparada con las cortezas somatosensorial y motora (Fig.14G-L). La presencia de células senescentes en el hipocampo es heterogénea entre individuos. Sin embargo, es visible en las regiones CA1, CA2 y CA3 a partir de Bregma -1.07mm (Fig.14G-L). En algunos cortes se acentúa en la región CA3 (Fig.14I-K). No obstante ello, en el conjunto del hipocampo la marca tiende a atenuarse a partir de Bregma -2.69mm (Fig.14L).

No se observó la presencia de células senescentes en el giro dentado. La marca de senescencia en la pared de los ventrículos laterales se aprecia en una intensidad intermedia, y comienza aproximadamente en Bregma 0.25mm. La marca de senescencia observada en la corteza piriforme es más intensa comparada con el fenotipo 1 (Fig.14A-K). Los detalles de la marca se observan en la figura 15.

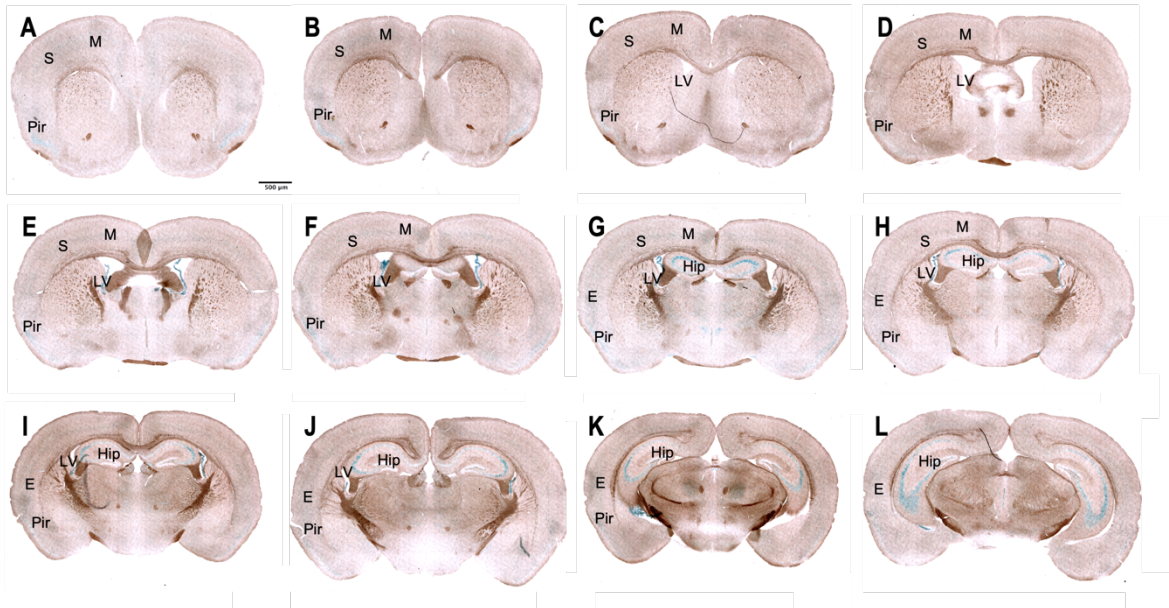


Figura 14. Fenotipo senescente 2. Cortes coronales representativos del telencéfalo de ratones que muestran la distribución anatómica de las células senescentes a lo largo del eje anteroposterior en el fenotipo 2. Se muestran las cortezas motora (M), somatosensorial (S), entorrinal (E), y piriforme (Pir), así como el hipocampo (Hip) y la pared de los ventrículos laterales (LV).

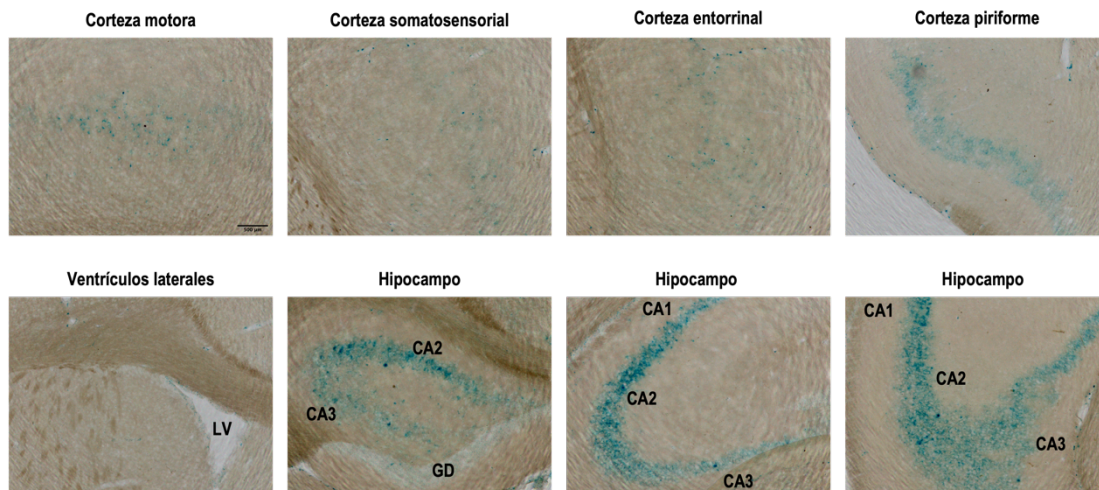


Figura 15. Fenotipo senescente 2. Ampliación de cortes coronales representativos que muestran la distribución anatómica de las células senescentes en el fenotipo 2. Se muestran las cortezas motora, somatosensorial, entorrinal, y piriforme, así como la pared de los ventrículos laterales (LV), y las diferentes regiones del hipocampo: giro dentado (GD), CA1, CA2 y CA3.

8.4.3. Fenotipo senescente 3

En este fenotipo la marca de senescencia en las cortezas somatosensorial y motora se encuentra en todos los cortes a lo largo del eje anteroposterior (Fig.16A-G). En Bregma [1.41mm,1.21mm] las células senescentes en la corteza motora son más abundantes y se organizan en pequeños grupos; este patrón muestra diferencias entre hemisferios (Fig.16A y B). A partir de Bregma 1.09 mm las células en la corteza motora se alinean en la capa V (Fig.16C-G). Por su parte, las células senescentes en la corteza somatosensorial (Bregma [1.41/-1.31mm]) también se alinean en la capa V (Fig.16A-G). Esta distribución no es exclusiva de las cortezas somatosensorial y motora, sino que se observa hacia la corteza entorrinal (Fig.16G-L). En la corteza entorrinal también pueden encontrarse células senescentes organizadas en pequeños grupos (Fig.16H y J) distribuidos heterogéneamente en su extensión. La intensidad de la marca observada en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo es heterogénea y se extiende anteroposteriormente (Bregma -1.31, -2.69mm; Fig.16G-L). En el giro dentado no se encuentra marca de senescencia. En las paredes de los ventrículos laterales la marca se observa muy intensa a partir de Bregma 0.13mm (Fig.16D-K). En la corteza piriforme la marca está visiblemente más acentuada comparada con los fenotipos 1 y 2, especialmente en los cortes que se ubican entre Bregma [1.41mm, -1.31mm] (Fig.16A-H). En esta etapa las células senescentes se observan en el núcleo de la rama vertical de la banda diagonal de Broca (VDB) (Fig.16B y C), en las porciones medial (MPOM) y lateral (MPOL) el núcleo preóptico medial (MPO) (Fig. 14D), en el núcleo hipotalámico dorsomedial (DM) (Fig. 16G), el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) (Fig.16I-K), en núcleo hipotalámico arcuato (Arc) (Fig.16I-K), y en las partes medial (MDM) y central (MDC) del núcleo talámico medio-dorsal (Fig.16F, G, H y J). En todos estos núcleos la marca es tenue y dispersa. Los detalles de la marca se observan en la figura 17.

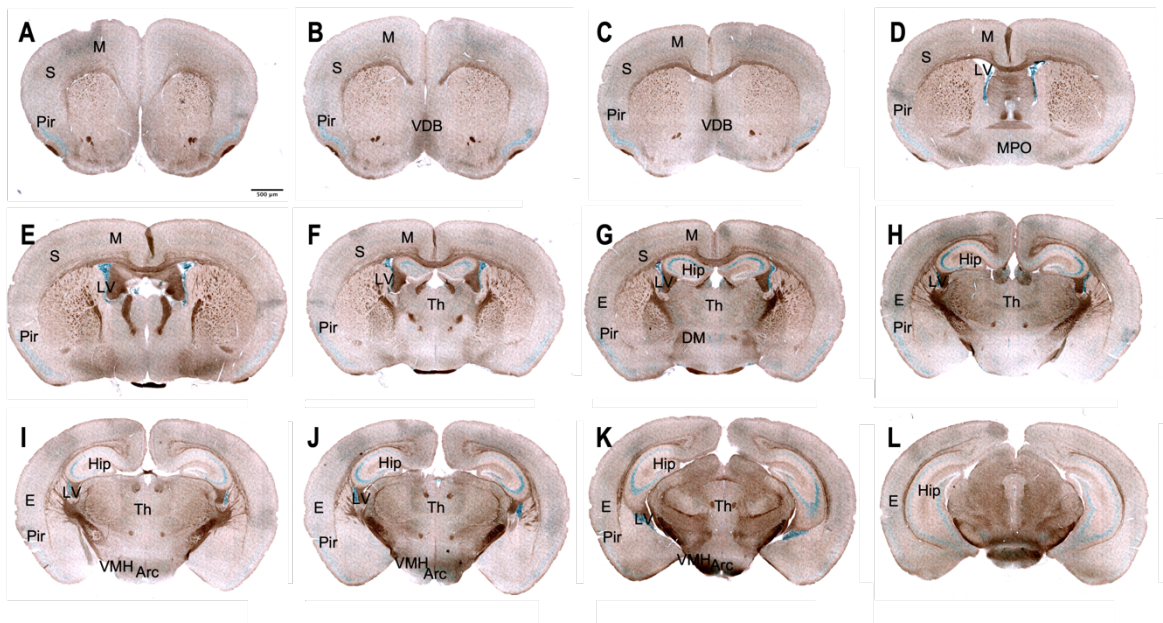


Figura 16. Fenotipo senescente 3. Cortes coronales representativos del telencéfalo de ratones que muestran la distribución anatómica de las células senescentes a lo largo del eje anteroposterior en el fenotipo 3. Se muestran las cortezas motora (M), somatosensorial (S), entorrinal (E), y piriforme (Pir), así como el hipocampo (Hip), la pared de los ventrículos laterales (LV), el núcleo de la rama vertical de la banda diagonal de Broca (VDB), el núcleo preóptico medial (MPO), el núcleo hipotalámico dorsomedial (DM), el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH), el núcleo hipotalámico arcuato (Arc) y el tálamo (Th).

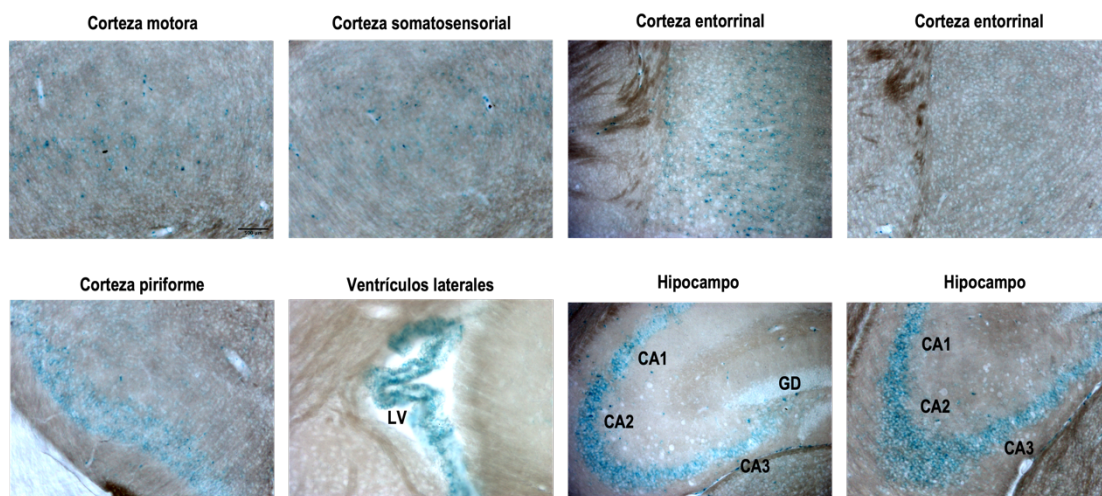


Figura 17. Fenotipo senescente 3. Ampliación de cortes coronales representativos que muestran la distribución anatómica de las células senescentes en el fenotipo 2. Se muestran las cortezas motora, somatosensorial, entorrinal y piriforme, así como la pared de los ventrículos laterales (LV), y las diferentes regiones del hipocampo: giro dentado (GD), CA1, CA2 y CA3.

8.4.4. Fenotipo senescente 4

En el fenotipo 4 la distribución de las células senescentes en las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora es similar a lo observado en el fenotipo 3 (Fig.18A-H). Sin embargo, a diferencia de éste, la intensidad de la marca en el hipocampo es alta y homogénea en las regiones CA1, CA2 y CA3 (Bregma: [-1.31, -2.27]) (Fig.18F-K). Hacia la región hipocampal posterior (Bregma: -2.69) la marca de senescencia es tenue (Fig.18L). No se observan células senescentes en el giro dentado, y en las paredes de ventrículos laterales la marca es intensa (Fig.18E-J). La presencia de células senescentes en la corteza piriforme aumenta con respecto al fenotipo 3, y es homogénea a lo largo del eje anteroposterior (Fig.18A-J). La marca se observa también en el tubérculo olfativo (Tu) (Fig.18B-D), en el núcleo de la rama vertical de la banda diagonal de Broca (VDB) (Fig.18A-C) y en el núcleo preóptico medial (MPO) (Fig.18-D). A nivel del tálamo, la marca se extiende a un mayor número de núcleos que incluyen: las porciones central, medial (MDM) y lateral (MDL) del núcleo talámico medio dorsal (MDC), el núcleo talámico paracentral (PC), núcleo talámico central medial (CM) y el núcleo talámico submedial (Sub) (Fig.18E-K). En este fenotipo, la marca también se observa en núcleo hipotalámico dorsomedial (DM) (Fig.18F-I), el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) (Fig.18I-K), y el núcleo arcuato (Arc) (Fig.18H-K). Las células senescentes también están presentes en las porciones posterodorsal (MePD) y posteroventral (MePV) del núcleo medial amigdalino (Fig.18H-J), los núcleos cortical anterior anterodorsal (MeAD) y anteroventral (MeAV) amigdalinos (Fig.18F y G), el núcleo basomedial anterior amigdalino (BMA), núcleo basolateral ventral amigdalino (BLV), el área cortical posterolateral amigdalina (PLCo), y el núcleo cortical anterior amigdalino (ACo) (Fig.18F-J). A partir de la coordenada Bregma -3.15mm en adelante, se observa marca en el área cortical posteromedial amigdalina (PMCo), el área de transición amigdalopiriforme (APir), la corteza entorrinal dorsolateral (DLEnt), y la corteza entorrinal intermedia dorsal (DIEnt) (Fig. 18L). Los detalles de la marca se observan en la figura 19.

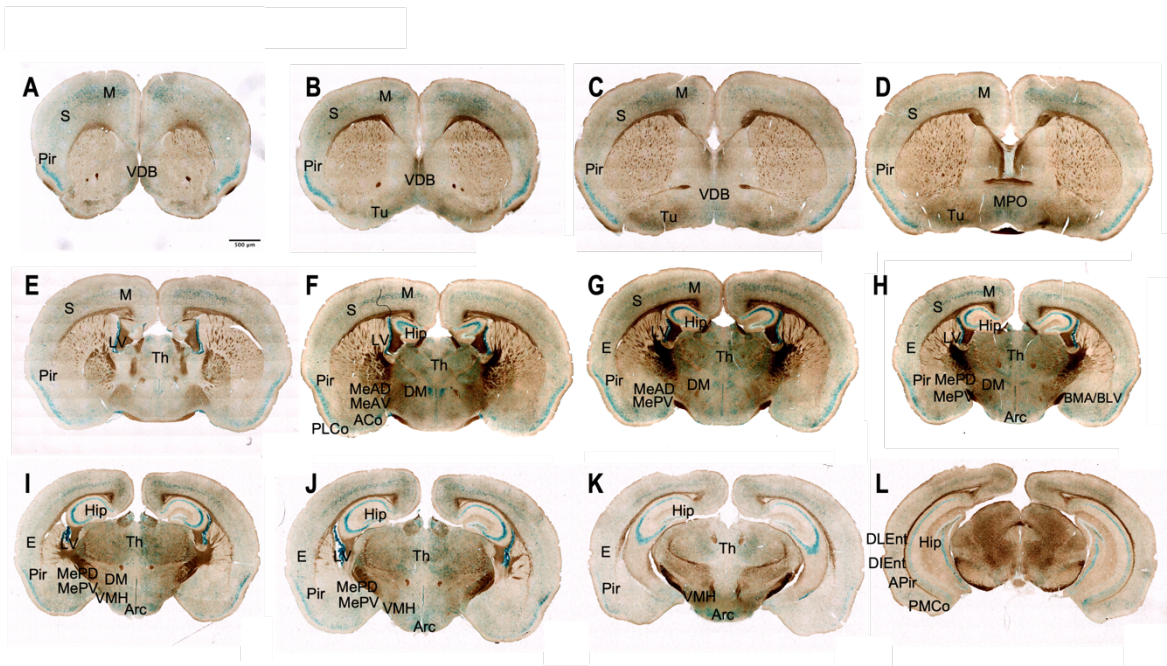


Figura 18. Fenotipo senescente 4. Cortes coronales representativos del telencéfalo de ratones que muestran la distribución anatómica de las células senescentes a lo largo del eje anteroposterior en el fenotipo 4. Se muestran las cortezas motora (M), somatosensorial (S), entorrinal (E), y piriforme (Pir), así como el hipocampo (Hip), la pared de los ventrículos laterales (LV), el núcleo de la rama vertical de la banda diagonal de Broca (VDB), el núcleo preóptico medial (MPO), el núcleo hipotalámico dorsomedial (DM), el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH), el núcleo hipotalámico arcuato (Arc), el tálamo (Th), el tubérculo olfativo (Tu), los núcleos medial posterodorsal (MePD) y posteroventral (MePV) amigdalinos, los núcleos cortical anterior anterodorsal (MeAD) y anteroventral (MeAV) amigdalinos, el núcleo basomedial anterior amigdalino (BMA), el núcleo basolateral ventral amigdalino (BLV), el área cortical posterolateral amigdalina (PLCo), el núcleo cortical anterior amigdalino (ACo), el área cortical posteromedial amigdalina (PMCo), el área de transición amigdalopiriforme (APir), la corteza entorrinal dorsolateral (DLEnt) y la corteza entorrinal intermedia dorsal (DIEnt).

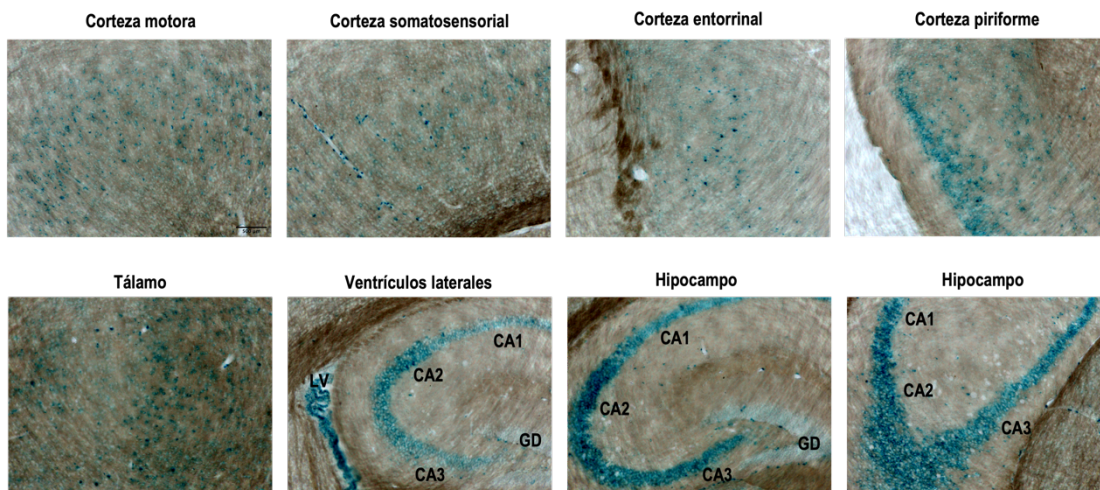


Figura 19. Fenotipo senescente 4. Ampliación de cortes coronales representativos que muestran la distribución anatómica de las células senescentes en el fenotipo 2. Se muestran las cortezas motora, somatosensorial, entorrinal y piriforme, así como la pared de los ventrículos laterales (LV), el tálamo, y las diferentes regiones del hipocampo: giro dentado (GD), CA1, CA2 y CA3.

9. DISCUSIÓN

Estudios realizados en pacientes con Parkinson y Alzheimer ponen de manifiesto que durante las fases iniciales e intermedias de la neurodegeneración, la muerte neuronal podría no ser el origen de la sintomatología. De manera alterna propusimos a la senescencia celular como un mecanismo unificador que permitiría explicar el proceso neurodegenerativo en ausencia de la muerte neuronal. Es conocido que el proceso neurodegenerativo ocurre de manera asincrónica en la corteza cerebral, siendo las cortezas entorrinal y motora las más afectadas durante las etapas tempranas de este proceso. De manera interesante, las células que integran ambas cortezas durante la etapa adulta son aquellas que se originaron de forma más temprana durante el desarrollo embrionario.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la hipótesis de que las regiones corticales integradas por poblaciones celulares cronológicamente más viejas acumulan un mayor número de células senescentes. De esta forma el patrón de neurodegeneración heterocrónico, característico de la corteza cerebral, podría ser explicado por la cronoarquitectura celular que se establece desde el periodo embrionario y hasta la etapa adulta. Así, este trabajo es una aproximación para evaluar la posibilidad, de que las etapas iniciales e intermedias de la enfermedad neurodegenerativa sean el resultado de la acumulación de células en estado senescente, y no una consecuencia de la pérdida masiva de poblaciones neuronales.

Al respecto, es de relevancia recordar, que los procesos degenerativos anteceden por ~20 años a la aparición de los síntomas clínicos (Braak et al., 2003b). Lo anterior significa que el inicio de la enfermedad neurodegenerativa ocurre durante la adultez temprana y no en la vejez. Es por ello, que el diseño experimental tiene la finalidad de explorar los procesos senescentes durante la edad adulta joven. Considerando que esto podría arrojar evidencia de las etapas iniciales de los procesos neurodegenerativos.

Como primer objetivo, se estableció la cronoarquitectura de las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora a los 60 días posnatales. Los resultados muestran que, en la mayoría de los ratones evaluados, las células que se originan entre los días embrionarios 11 y 14, se organizan siguiendo un gradiente radial, en el que las células de las capas V y VI son las primeras en formarse, las células de las capas III y IV son generadas después, y las células de la capa II son las últimas en establecerse. Este gradiente de organización coincide con lo reportado previamente en la literatura (Bayer & Altman, 1991). Notamos, sin embargo, que tres ratones marcados con BrdU tuvieron relativamente una mayor cantidad de células marcadas en la capa II, al ser comparados con el resto de los ratones. Esta observación sugiere que los primeros pudieran haber adelantado el proceso de formación de las cortezas somatosensorial y motora, evidenciado así que el desarrollo de la corteza cerebral es asincrónico en la población.

En estudios previos se reportó que las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora están integradas por un porcentaje considerable de células nacidas entre los días embrionarios 15 y 20 (Bayer, 1980).

Esto significa que la cronoarquitectura cortical evaluada en el presente trabajo, incluyó únicamente el 50% de los días en los que se originan las células que conforman a las diferentes regiones corticales de interés, en la etapa adulta. Además, de acuerdo con la clasificación de las células por su día de origen, aquellas nacidas entre los días embrionarios 11 y 14 pertenecen únicamente al grupo de las células viejas. Este hecho podría explicar que nuestros datos señalen que no existe diferencia en la edad cronológica de las cortezas somatosensorial y motora, como se reportó anteriormente (Bayer & Altman, 1991). Por lo tanto, en futuros experimentos, será necesario evaluar el destino de las células que se originan entre los días embrionarios 15 y 20, de esta forma será posible establecer con mayor certeza la edad cronológica de las áreas corticales, y su relación con la acumulación de células senescentes en las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora.

Como segundo objetivo, se evaluó si la acumulación de células senescentes está relacionada con la cronoarquitectura de las diferentes regiones corticales. De ser así, esperaríamos que la corteza entorrinal, que contiene células cronológicamente más viejas, mostrara una mayor acumulación de células senescentes. Sin embargo, los resultados muestran que no existe una relación directa, bajo las condiciones experimentales utilizadas, entre la cronoarquitectura de las cortezas y la acumulación de células senescentes. A pesar de ello, en más del 90% de los sujetos se observó la presencia de células senescentes en las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora. Por su ubicación es probable que estas células se hayan originado en el día embrionario 12 y 13. Al respecto, es importante señalar que las células que conforman la corteza cerebral en la etapa adulta se organizan por medio de un gradiente. Por lo tanto, el análisis realizado no permite determinar con certeza el día de origen de las células senescentes. En el futuro, se deberá implementar el uso de técnicas de colocalización que permitan evaluar con mayor precisión el día de nacimiento de las células senescentes y su estirpe celular.

Por otra parte, en el 30% de los individuos, la corteza motora muestra un mayor número de células senescentes en comparación con las cortezas entorrinal y somatosensorial. Este dato toma relevancia en el contexto de la neurodegeneración, ya que es sabido que la corteza motora es una de las primeras regiones corticales en acumular agregados tóxicos de proteínas. En próximos experimentos será importante evaluar el microambiente de las células motoras, para determinar las causas que las hacen más susceptibles a desarrollar el fenotipo senescente.

Aunado a lo anterior, se observa la presencia de células senescentes en el hipocampo, las paredes de los ventrículos laterales, el tálamo, el hipotálamo, la corteza piriforme y la amígdala. La distribución de las células senescentes en estas regiones es heterogénea entre individuos de la misma edad marcados o no con BrdU en la misma edad gestacional. Esta observación, evidencia nuevamente que el desarrollo celular interindividual del cerebro en la población de ratones evaluados es heterocrónica, por lo que suponemos que las células ubicadas en las mismas regiones envejecen diferencialmente, individual y poblacionalmente. Con relación a este hecho, debemos recordar que en el presente trabajo se evaluó únicamente la edad cronológica de las células. Sin embargo, podemos distinguir entre edad cronológica y edad biológica. En la segunda, no sólo se considera el tiempo transcurrido desde el

nacimiento hasta una fecha determinada, sino que se toma en cuenta la influencia de factores genéticos y del microambiente celular (Maltoni et al., 2022), que podrían favorecer una tasa de envejecimiento diferencial en regiones o células específicas. Por lo tanto, será importante incorporar marcadores de envejecimiento biológico que nos permitan dilucidar la predisposición de áreas y poblaciones celulares a senescer de manera anticipada o tardía. Finalmente, es posible que los cuatro fenotipos senescentes descritos, representen alternativas del manejo individual de los tiempos de desarrollo. Sin embargo, los datos mostrados son resultados preliminares que deberán ser corroborados con un diseño experimental más robusto, que haga posible dilucidar la validez de estas nociones.

Si bien, los resultados indican que la cronoarquitectura cortical no predice la acumulación de células senescentes en las distintas regiones corticales, sí aportan a la comprensión del proceso neurodegenerativo. En primer lugar, la presencia de células senescentes en diferentes regiones cerebrales encontradas en la adultez temprana, apoya la noción de que el inicio del proceso neurodegenerativo no es concurrente del envejecimiento; parecería ser, más bien, un proceso continuo que ocurre a lo largo de la maduración de los individuos. En segundo lugar, la heterocronía en la expresión del fenotipo senescente enfatiza la importancia de estudiar el microambiente celular, para comprender los procesos degenerativos que ocurren en el sistema nervioso. Lo anterior, podría explicar, por un lado, por qué algunas regiones cerebrales son más susceptibles al proceso de neurodegeneración y, por otro, el espectro de fenotipos observados de estas enfermedades. Por último, la acumulación excesiva de células senescentes que se observa en algunos sujetos, podría ser un indicio de que los déficits conductuales y cognitivos en etapas tempranas de la neurodegeneración, no son el resultado de la muerte neuronal. Sin embargo, para determinar esto será necesario implementar una metodología que permita establecer una correlación entre la acumulación de células senescentes y el desempeño cognitivo de los sujetos.

No obstante los hallazgos del presente trabajo, la senescencia celular es un fenómeno biológico complejo, en el cual diferentes mecanismos celulares y moleculares ocurren de manera simultánea. Por lo tanto, se vuelve fundamental incluir biomarcadores adicionales que permitan corroborar el estado senescente de las células marcadas con SA- β -gal. Siendo ésta, una de las principales limitaciones metodológicas del presente trabajo.

10. CONCLUSIONES

1. Las células que se originaron entre los días embrionarios 11 y 14 se organizan diferencialmente en las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora, en la etapa adulta. Concediendo a cada una de las regiones corticales una edad cronológica diferente.
2. La acumulación de células senescentes en las cortezas somatosensorial, entorrinal y motora no se correlaciona con la edad cronológica de cada una de las cortezas. Sin embargo, células senescentes pudieron ser observadas en estas áreas.
3. En aproximadamente el 30% de los individuos se encontró un mayor número de células senescentes en la corteza motora, en comparación con la corteza somatosensorial y entorrinal.
4. Las células senescentes se localizan en diferentes regiones cerebrales que incluyen hipocampo, corteza piriforme, ventrículos laterales, tálamo, hipotálamo y amígdala.
5. El patrón de distribución de células senescentes en el cerebro es heterogéneo entre individuos de la misma edad a lo largo de la población.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreone, B. J., Larhammar, M., & Lewcock, J. W. (2020). Cell Death and Neurodegeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(2), a036434. doi:10.1101/cshperspect.a036434

Bayer S. A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *The Journal of comparative neurology*, 190(1), 87–114. doi: 10.1002/cne.901900107

Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., Johnson, F. B., Trojanowski, J. Q., Sell, C., & Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PloS one*, 7(9), e45069. doi: 10.1371/journal.pone.0045069

Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience letters*, 396(1), 67–72. doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.012

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003a). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 24(2), 197–211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9

Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003b). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 110(5), 517–536. doi: 10.1007/s00702-002-0808-2

Buss, R. R., Sun, W., & Oppenheim, R. W. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annual review of neuroscience*, 29, 1–35. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800

Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., & Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, 562(7728), 578–582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y

Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–740. doi: 10.1038/nrm2233

Codolo, G., Plotegher, N., Pozzobon, T., Brucale, M., Tessari, I., Bubacco, L., & de Bernard, M. (2013). Triggering of inflammasome by aggregated α -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PloS one*, 8(1), e55375. doi: 10.1371/journal.pone.0055375

Coelho, D. S., & Domingos, P. M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Frontiers in genetics*, 5, 76. doi: 10.3389/fgene.2014.00076

d'Adda di Fagagna F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews. Cancer*, 8(7), 512–522. doi: 10.1038/nrc2440

de Calignon, A., Spires-Jones, T. L., Pitstick, R., Carlson, G. A., & Hyman, B. T. (2009). Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 68(7), 757–761. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181a9fc66

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12), 1798–1806. doi: 10.1038/nprot.2009.191

Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(2), 75–95. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w

Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. (2007). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3rd Edition. Academic Press.

Gong, B., Radulovic, M., Figueiredo-Pereira, M. E., & Cardozo, C. (2016). The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Spinal Cord Injury. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 4. doi: 10.3389/fnmol.2016.00004

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6

Hetz, C., & Saxena, S. (2017). ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nature reviews. Neurology*, 13(8), 477–491. doi: 10.1038/nrneurol.2017.99

Jellinger, K. A., & Stadelmann, C. (2001). Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 3(1), 31–40. doi: 10.3233/jad-2001-3106

Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tsolou, A., Gonos, E. S., Thrasivoulou, C., Saffrey, M. J., Cameron, K., & von Zglinicki, T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging cell*, 11(6), 996–1004. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x

Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 645593. doi: 10.3389/fcell.2021.645593

Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., & Ferbeyre, G. (2019). The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 117, 15–22. doi: 10.1016/j.cyto.2019.01.013

Maltoni, R., Ravaioli, S., Bronte, G., Mazza, M., Cerchione, C., Massa, I., Balzi, W., Cortesi, M., Zanoni, M., & Bravaccini, S. (2022). Chronological age or biological age: What drives the choice of adjuvant treatment in elderly breast cancer patients? *Translational oncology*, 15(1), 101300. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101300

Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2020). Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 16. doi: 10.3389/fncel.2020.00016

Matjusaitis, M., Chin, G., Sarnoski, E. A., & Stolzing, A. (2016). Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing research reviews*, 29, 1–12. doi: 10.1016/j.arr.2016.05.003

Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., & Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences*, 39(5), 245–254. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.008

McKinnon, C., & Tabrizi, S. J. (2014). The ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, 21(17), 2302–2321. doi: 10.1089/ars.2013.5802

Miura M. (2012). Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a008664. doi: 10.1101/cshperspect.a008664

Moreno-Blas, D., Gorostieta-Salas, E., Pommer-Alba, A., Muciño-Hernández, G., Gerónimo-Olvera, C., Maciel-Barón, L. A., Konigsberg, M., Massieu, L., & Castro-Obregón, S. (2019). Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Ageing*, 11(16), 6175–6198. doi: 10.18632/aging.102181

Musi, N., Valentine, J. M., Sickora, K. R., Baeuerle, E., Thompson, C. S., Shen, Q., & Orr, M. E. (2018). Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Ageing cell*, 17(6), e12840. doi: 10.1111/accel.12840

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 12(5), 913–922. doi: 10.1007/s10495-007-0756-2

Park, J. T., Lee, Y. S., Cho, K. A., & Park, S. C. (2018). Adjustment of the lysosomal-mitochondrial axis for control of cellular senescence. *Ageing research reviews*, 47, 176–182. doi: 10.1016/j.arr.2018.08.003

Read, A., & Schröder, M. (2021). The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology*, 10(5), 384. doi: 10.3390/biology10050384

Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), 973–979. doi: 10.1038/ncb1909

Sarnat, H. (1992). Neocortical Development. 1991. First edition. Shirley A. Bayer and Joseph Altman. Published by Raven Press, New York. 255 pages. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 19(2), 312-312. doi:10.1017/S0317167100042414

Schwartz, A. L., & Ciechanover, A. (2009). Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49, 73–96. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340

Shi, Y., & Holtzman, D. M. (2018). Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nature reviews. Immunology*, 18(12), 759–772. doi: 10.1038/s41577-018-0051-1

Si, Z., Sun, L., & Wang, X. (2021). Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 137, 111327. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111327

Smith, H. L., & Mallucci, G. R. (2016). The unfolded protein response: mechanisms and therapy of neurodegeneration. *Brain: a journal of neurology*, 139 (Pt 8), 2113–2121. doi: 10.1093/brain/aww101

Islam M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological research*, 39(1), 73–82. doi: 10.1080/01616412.2016.1251711

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1-2), 37–56. doi: 10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89

Van Houten, B., Woshner, V., & Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA repair*, 5(2), 145–152. doi: 10.1016/j.dnarep.2005.03.002

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8692–8700. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003

Voet, S., Srinivasan, S., Lamkanfi, M., & van Loo, G. (2019). Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO molecular medicine*, 11(6), e10248. doi: 10.15252/emmm.201810248

West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., & Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 344(8925), 769–772. doi: 10.1016/s0140-6736(94)92338-8

Yamaguchi, Y., & Miura, M. (2015). Programmed cell death in neurodevelopment. *Developmental cell*, 32(4), 478–490. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.019

Yang, N., & Sen, P. (2018). The senescent cell epigenome. *Aging*, 10(11), 3590–3609. doi: 10.18632/aging.101617

Yarmohammadi, F., Wallace Hayes, A., Najafi, N., & Karimi, G. (2020). The protective effect of natural compounds against rotenone-induced neurotoxicity. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 34(12), e22605. doi: 10.1002/jbt.22605

Zhu, X., Wang, Y., Ogawa, O., Lee, H. G., Raina, A. K., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Fujioka, H., Shimohama, S., Tabaton, M., Atwood, C. S., Petersen, R. B., Perry, G., & Smith, M. A. (2004). Neuroprotective properties of Bcl-w in Alzheimer disease. *Journal of neurochemistry*, 89(5), 1233–1240. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02416.x

Zolochavska, O., Bjorklund, N., Woltjer, R., Wiktorowicz, J. E., & Tagliatela, G. (2018). Postsynaptic Proteome of Non-Demented Individuals with Alzheimer's Disease Neuropathology. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 65(2), 659–682. doi: 10.3233/JAD-180179