



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

“EFECTO DE LA D-SERINA SOBRE LA FLEXIBILIDAD COGNITIVA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO: UN ESTUDIO LONGITUDINAL”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO (A) EN CIENCIAS

PRESENTA:

ING. BÁRBARA AURORA VÁZQUEZ PRIETO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MÓNICA ANDREA LÓPEZ HIDALGO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES (ENESJ)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. REBECA CORONA GARCÍA-CABRAL
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM

DR. ROBERTO EMMANUELLE MERCADILLO CABALLERO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-UNIDAD IZTAPALAPA

CAMPUS UNAM JURQUILLA, QUERÉTARO, QRO MÉXICO ENERO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**«...el secreto de una buena vejez no es otra cosa que un pacto honrado con la
soledad.»**

Gabriel García Márquez. Cien años de soledad,

A Aurora Guadalupe Prieto González

Para mi mejor amiga, la deslumbrante mujer de la que recibí mi nombre y mi sangre. Mi mamá jamás me dejó pensar que no podría hacer exactamente lo que quisiera o ser lo que quería ser.

A Magnolia González Torrano

Donde quiera que estes espero que seas libre. Te amo.

A Jesús Vázquez Silva

Por apoyarme en cada paso y no dejar que me rindiera

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No. 778596 para la realización de mis estudios de maestría, al proyecto CONACyT Ciencia de Frontera 171874 y PAPIIT-DGAPA IA208120 y IA208022.

A la Dra. Maricela Luna Muñoz, Coordinadora del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología).

A mi tutora, la Dra. Mónica López Hidalgo por su apoyo constante dentro y fuera del laboratorio desde hace años.

A los miembros de mi comité tutorial, a la Dra. Rebeca Corona y el Dr. Roberto Mercadillo por su apoyo durante la maestría en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Rojas y Dr. Rafel Olivares por su apoyo constante en el laboratorio.

A la Dra. Alejandra Castilla, Dr. Martín Garcia Servin y la Dra Maria Antonieta Carbajo Mata del Bioterio del Instituto de Neurobiología

Al Dr. Juan Ortiz-Retana del LANIREM por el apoyo técnico.

Al Dr. Leopoldo González Santos y la M.C Laura Nava Gómez por el apoyo técnico.

A la Dra. Deisy Gasca Martínez de la Unidad de Análisis Conductual.

A todos mis compañeros del A-13 por su apoyo y las risas: Martín, Moy, Juliana y Jon.

A mi segunda familia del aginglab: A Ale por sus consejos, medio regaños, alimentarme, las risas y estar para mi en momentos difíciles. A Angie por las risas, los libros, su confianza y consejos de la vida. A Frida por la canciones compartidas, los abrazos, los memes y todas nuestras risas. ¿Quién lo diría? A Vale por ser tan especial y siempre ella, por nuestro tiempo juntas. A Vero (aginglab honoraria) por las horas escuchando Sabina, las pláticas, momentos juntas y risas.

A mis compañeros de casa y laboratorio. A Paola por ser mi amiga y enseñarme tantas cosas dentro del laboratorio como afuera. A Alejandro por sacarme una sonrisa, y las pláticas. A Napis y Max por estar conmigo y siempre recibirme con esa felicidad.

A mis Amix que hice durante esta maestría, el mejor regalo que me dejó. Especialmente la orden del puma por todas las veces que estuvimos juntos, mi único arrepentimiento es no haber pasado más tiempo con ellos.

A Cecy por ser ella, las risas y la confianza que nos tenemos.

A Damniela por todos los memes, abrazos y carcajadas. Lo que Taylor unió que no lo separe el hombre.

A Denisse por las pláticas y las risas.

A Poblano por ser mi padrino, todos los memes y el apoyo.

A mi familia por apoyarme en este proceso para poder continuar con mis sueños.

A mis amigas Cary y Paula por su amistad desde la universidad, las risas y apapachos aquí seguimos.

A Juan Pablo por su apoyo incondicional.

A T.S por todas las veces que me acompaño.

Resumen

El deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento está relacionado con cambios estructurales y funcionales en el cerebro. Una de las teorías que busca explicar las diferencias entre las trayectorias del declive cognitivo es la reserva cognitiva, donde diferencias en la fisiología y la anatomía permiten que algunos individuos mantengan mejores funciones cognitivas. Los receptores NMDA tienen un papel fundamental en diversas funciones cognitivas, para su activación se requiere la unión del glutamato y la D-serina. Durante el envejecimiento, los niveles de D-serina disminuyen, lo que se ha relacionado con déficits cognitivos. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la suplementación de D-serina en ratas envejecidas restaura la flexibilidad cognitiva, la conectividad funcional y la densidad de las espinas dendríticas que se ven afectadas por la edad. Sin embargo, no está claro cómo la D-serina puede afectar la flexibilidad cognitiva en ratas con un incremento en la reserva cognitiva. Las ratas fueron entrenadas en una tarea de aprendizaje inverso y el número de perseveraciones se cuantificó como una medida inversa de la flexibilidad cognitiva. Las ratas de mediana edad (12 meses) tuvieron un desempeño inferior que las ratas jóvenes (6 meses), lo que indica una disminución de la flexibilidad cognitiva. Luego, las ratas se asignaron al azar en dos grupos, 1) el grupo que se suplementó con D-serina (300 mg/kg) en el agua de beber por dos meses antes de la prueba de flexibilidad cognitiva, y 2) el grupo de control que recibió sólo agua regular. Ambos grupos tuvieron una segunda evaluación de la flexibilidad cognitiva a los 18 meses (mediana edad tardía). Encontramos que las ratas de mediana edad tardía mejoraron el desempeño en la segunda evaluación, sin embargo, el 26% de las ratas de mediana edad suplementadas con D-serina, disminuyeron la flexibilidad cognitiva. Luego nos preguntamos cómo se relacionó el rendimiento de las ratas y el efecto de la D-serina con la conectividad funcional del cerebro medida con fMRI en estado de reposo. Observamos una disminución de la conectividad funcional entre las áreas como el cíngulo, la corteza retroesplenial, la corteza frontal de asociación, la corteza dorsolateral prefrontal y el estriado que se asocian con la flexibilidad cognitiva en aquellas ratas afectadas por la suplementación con D-serina en su número de perseveraciones. Estos resultados indican que la suplementación crónica con D-serina puede producir un detrimento de flexibilidad cognitiva en ratas con un buen desempeño a mediana edad.

Summary

Cognitive decline associated with aging is related to structural and functional changes in the brain. One of the theories that tries to explain the differences between the trajectories of cognitive decline is a cognitive reserve, where differences in physiology and anatomy allow some individuals to maintain better cognitive functions. NMDA receptors play a pivotal role in many cognitive functions, for their activation, the binding of glutamate and D-serine is required. During aging, D-serine levels decrease, which has been linked to cognitive deficiencies. In our laboratory, D-serine supplementation in aged rats has been shown to restore cognitive flexibility, functional connectivity, and dendritic spine density that are affected by age. However, it is unclear how D-serine affects cognitive flexibility in rats with an incremented cognitive reserve. Rats were trained on a reverse learning task and the number of perseverations was quantified as a reverse measure of cognitive flexibility. Middle-aged rats (12 months) performed less well than young rats (6 months), indicating decreased cognitive flexibility. The rats were then randomized into two groups, 1) the group that was supplemented with D-serine (300 mg/kg) in the drinking water for two months before the cognitive flexibility test, and 2) the group control that received only regular water. Both groups had a second assessment of cognitive flexibility at 18 months (late middle age). We found that late-middle-aged rats improved their performance at the second evaluation, however, 26% of D-serine-supplemented middle-aged rats decreased their cognitive flexibility. We then show how rat performance and the effect of D-serine were related to functional brain connectivity measured during resting-state fMRI. We observed decreased functional connectivity between brain areas associated with cognitive flexibility (the cingulate cortex, retrosplenial cortex, frontal association cortex, dorsolateral prefrontal cortex and striatum) in those rats affected by D-serine supplementation in their number of perseverations. These results indicate that chronic D-serine supplementation may impair cognitive flexibility in middle-aged performing rats.

Introducción	10
2. Antecedentes	12
2.1 Cambios estructurales y morfológicos del sistema nervioso asociados con el envejecimiento	12
2.1.1 Efecto del envejecimiento sobre las neuronas y las células gliales	12
2.2 Declive cognitivo asociado al envejecimiento	13
2.2.1 Disminución en la conectividad funcional durante el envejecimiento.....	14
2.2.2 Los receptores NMDA durante el envejecimiento	15
2.2.3 Fisiología, metabolismo y papel de la D-serina en el envejecimiento.....	16
2.2.4 Participación del receptor NMDA en la flexibilidad cognitiva.....	19
2.2.5 Reserva, mantenimiento & compensación: mecanismos para afrontar el declive cognitivo	20
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general:	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. Metodología	26
5.1 Animales.....	26
5.2 Suplementación de D-serina.....	26
5.3 Tarea de aprendizaje inverso.....	27
5.3.1 Equipo	27
5.3.2 Entrenamiento	27
5.3.3 Evaluación de la flexibilidad cognitiva	27
5.3.4 Reentrenamiento	28
5.4 Resonancia Magnética funcional.....	28
5.4.1 Adquisición de imágenes estructurales y funcionales	29
5.4.2 Preprocesamiento.....	29
5.4.3 Análisis	30
5.5 Pruebas estadísticas	30
6. Resultados	32
6.1 La flexibilidad cognitiva mejora con una previa evaluación	32
6.2 Reentrenamiento y reevaluación a los 24 meses	37
6.3 Cambios en la conectividad funcional durante el envejecimiento	40

7. Discusión 47

 7.1 Adquisición de la tarea 47

 7.2 Efecto de la reserva cognitiva sobre la flexibilidad cognitiva 48

 7.3 Efecto de la D-serina en la reserva cognitiva sobre la flexibilidad cognitiva 50

8 Conclusiones 54

9. Referencias..... 55

Introducción

El envejecimiento está acompañado con cambios que conducen a deficiencias de distintas funciones fisiológicas. El sistema nervioso central presenta distintos cambios fisiológicos, anatómicos y en la conectividad funcional. A nivel de conectividad funcional, utilizando resonancia magnética funcional, se ha observado una disminución en la conectividad funcional del cerebro la cual se ha relacionado con déficits en diversas pruebas cognitivas (Ash et al., 2016; Febo et al., 2020; Liang et al., 2020; Nava-Gómez & Calero Vargas et al., 2022).

Durante el envejecimiento distintas funciones cognitivas se ven afectadas, siendo especialmente susceptibles a cambios las asociadas con la corteza prefrontal como la atención, memoria de trabajo o la flexibilidad cognitiva (Mota et al., 2019; Ménard & Quirion, 2012). Déficits en estas funciones cognitivas se han asociado a una menor transmisión glutamatérgica mediada por los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (Kumar, 2015; Magnusson, 2012). Estos receptores tienen un papel en distintos tipos de plasticidad como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) y por ende en diversas funciones cognitivas. Para su activación es necesaria la despolarización de la membrana para remover al Mg^{+2} , la unión del glutamato y de su co-agonista la D-serina (Papouin et al., 2012). La D-serina es un aminoácido presente en el sistema nervioso central de mamíferos (Wolosker, 2009). Se sintetiza de manera endógena a partir de la L-serina por acción de la serina racemasa (SR) (Wolosker et al., 1999). Las concentraciones de D-serina cambian a lo largo de la vida, durante etapas tempranas un incremento de la D-serina se relaciona con el desarrollo cerebral (Balu y Coyle, 2012; Diniz et al., 2012). Mientras que en el envejecimiento se ha observado una disminución de la concentración de D-serina la cual está acompañada de una reducción en la activación de los receptores NMDA (Junjaud et al., 2006; Turpin et al., 2011). La disminución en la concentración de la D-serina podría estar relacionada con el declive cognitivo asociado al envejecimiento. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que la suplementación con D-serina revierte la disminución de la flexibilidad cognitiva y restaura

la conectividad funcional en ratas envejecidas (18 y 24 meses) (Nava-Gómez, Calero Vargas et al., 2022).

Otra característica del declive cognitivo asociada al envejecimiento es que no se presenta de manera homogénea entre individuos. La teoría de la reserva cognitiva trata de explicar estas diferencias entre individuos. Donde la reserva se puede definir como el aumento de los recursos neurales a lo largo de la vida que mitigan los efectos del deterioro neuronal causado por el envejecimiento. Los recursos neurales se refieren a los recursos anatómicos y fisiológicos del cerebro que median los procesos cognitivos por ejemplo el volumen de materia gris, los niveles de neurotransmisores, el papel de una región o el funcionamiento de una red cerebral evaluada mediante métodos de conectividad funcional entre otros (Cabeza et al., 2018). En animales de laboratorio se ha observado que experiencias enriquecedoras promueven cambios plásticos en el cerebro y a su vez mejoran el desempeño en distintas pruebas conductuales (Freret et al., 2012; Garthe et al., 2016; Gelfo et al., 2011; Kolb et al., 2003; Kumar et al., 2012). En este sentido el presente trabajo pretende caracterizar el efecto de la D-serina sobre la flexibilidad cognitiva facilitada por la reserva cognitiva.

2. Antecedentes

2.1 Cambios estructurales y morfológicos del sistema nervioso asociados con el envejecimiento

El envejecimiento se puede considerar como el resultado de la acumulación gradual, través del tiempo, de cambios biológicos caracterizados por la pérdida progresiva de distintas funciones fisiológicas (Cole et al., 2018). Estos cambios amenazan la integridad del organismo que conduce a funciones deterioradas. El sistema nervioso es uno de los sistemas más estudiados durante el envejecimiento el cual sufre cambios que van de lo molecular a los estructural. Dentro de los cambios estructurales se ha reportado una disminución en el volumen en distintas estructuras como son la corteza prefrontal, el estriado, el lóbulo temporal y el hipocampo; así como un ensanchamiento de los ventrículos (Figura 1A) (Peters et al., 2006; Trollor et al., 2001; Humayun & Yao, 2019).

2.1.1 Efecto del envejecimiento sobre las neuronas y las células gliales

A nivel celular se ha observado una disminución en el número de neuronas (Freeman et al., 2008), en la complejidad de la extensión de sus ramificaciones dendríticas (Pannese et al., 2011, Sotoudeh; 2020), así como en el número de espinas dendríticas, aunque dichos cambios dependen de la estructura cerebral que se analice. Por ejemplo, en la corteza prefrontal, la densidad de espinas dendríticas disminuye alrededor del 30% en ratas envejecidas, siendo más susceptibles las espinas dendríticas pequeñas y delgadas, en comparación con las de forma de hongo (Figura 1B) (Bloss et al., 2011; Dumitriu et al., 2010).

Además de los componentes neuronales, el sistema nervioso contiene células gliales como son la microglía, los oligodendrocitos y los astrocitos. La microglía son las células inmunes que se encargan de responder ante lesiones y patógenos mediante la liberación de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Los oligodendrocitos son las células responsables de la mielinización de los axones mientras que los astrocitos tienen distintas funciones entre las que destacan regular la homeostasis extracelular, el metabolismo de las neuronas y participar de manera activa en la sinapsis (fenómeno

conocido como sinapsis tripartita) (Nerve cells, Neural Circuitry and Behavior; Kandel, 2013).

Durante el envejecimiento, la microglía puede promover estados proinflamatorios y comprometer la respuesta inmune, lo que puede llevar a una función neuronal alterada. Los oligodendrocitos sufren cambios en su morfología que se reflejan en una disminución de la mielinización de axones y en su diferenciación lo que resulta en menor número de oligodendrocitos maduros en el cerebro envejecido. De igual manera, los astrocitos sufren cambios durante el envejecimiento que pueden generar un desbalance en la homeostasis y en la regulación de la actividad neuronal (Salas et al., 2020). En este sentido, se ha observado que existe una disminución en la interacción con la sinapsis y un aumento en sus procesos proinflamatorios lo que puede comprometer la fisiología del cerebro (Beltran y Castillo et al., 2018; Palmer & Ousmun, 2018; Salas et al., 2020).

2.2 Declive cognitivo asociado al envejecimiento

Una de las principales características asociadas con el envejecimiento es el declive de diversas funciones cognitivas. Algunas de las más afectadas son la velocidad de procesamiento, la atención, el control inhibitorio y distintos tipos de memoria como son la del largo plazo, la memoria episódica y la memoria espacial (Magnusson et al., 2014; Murman, 2015; Taylor & Francis; 2007). En otros animales también se ha observado el declive de funciones cognitivas asociadas al envejecimiento (Altun et al., 2007) con características y mecanismos similares a las descritas en humanos (Taylor & Francis; 2007). Por ejemplo, en roedores viejos (24-42 meses) se ha observado una disminución en el desempeño en la memoria espacial, el cual está acompañado con cambios en el hipocampo (Ménard et al., 2014; Mota et al., 2019). De igual manera, se ha observado una disminución en funciones cognitivas asociadas con la actividad de estructuras cerebrales como la corteza prefrontal entre las que destacan la atención, la memoria de trabajo y la flexibilidad cognitiva en roedores desde los 18 meses (Bizon et al., 2012; Mota et al., 2019; Nava-Gómez, Calero Vargas et al., 2022).

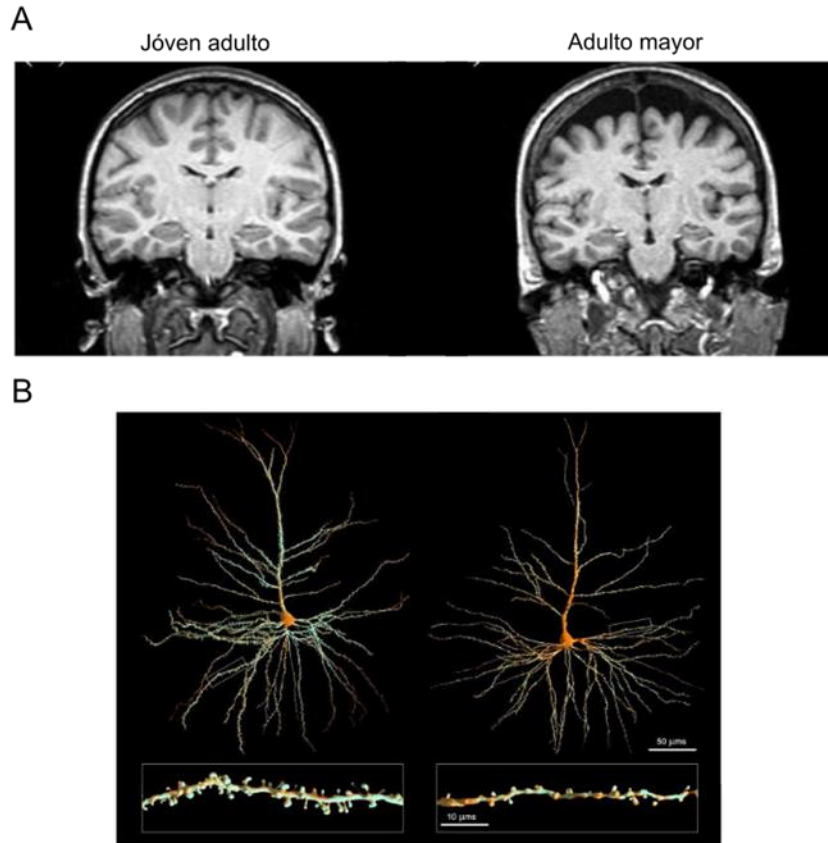


Figura 1. Cambios morfológicos en el cerebro de sujetos viejos. A, Imágenes por resonancia magnética (corte coronal) de un cerebro de un sujeto joven (izquierda) y un cerebro de un adulto mayor (derecha) Se puede observar atrofia cerebral representando como una disminución en el volumen cerebral y un ensanchamiento de los ventrículos (Modificada de Zuyao Y Shan y colaboradores 2015). B. Reconstrucción tridimensional de neuronas corticales prefrontales de monos jóvenes (izquierda) y envejecidos (derecha), es posible observar como la densidad de las espinas dendríticas se ven reducidas en el animal envejecido (Modificado de Morrison, J.H., & Baxter, M.G. 2012).

2.2.1 Disminución en la conectividad funcional durante el envejecimiento

Una de las características que disminuye en el envejecimiento y afecta las funciones cognitivas es la conectividad funcional cerebral, la cual busca reflejar el nivel de conectividad entre regiones anatómicamente separadas basándose en sus patrones de activación (van den Heuvel & Hulshoff Pol, 2010). Esta se puede cuantificar con resonancia magnética funcional (fMRI). La fMRI mide indirectamente la activación neuronal utilizando la señal dependiente del nivel de oxígeno en la sangre (BOLD). En roedores, la mayoría de los estudios de conectividad funcional se realizan en estado de

reposo, (bajo anestesia) debido a las limitaciones de mantener a los animales inmóviles durante el escaneo. La fMRI en estado de reposo (rs-fMRI) a diferencia de fMRI convencional se adquiere en ausencia de un estímulo o una tarea. El principio de rs-fMRI también se basa en la fluctuación de la señal BOLD y se enfoca en alteraciones de esta señal (Lv et al., 2018). En estos estudios se ha observado una disminución en la conectividad funcional entre el hipocampo y la corteza retrosplenial, la cual se asocia con un desempeño deteriorado en ratas de mediana edad (12 meses) y envejecidas (24 meses) en tareas de memoria (Ash et al., 2016; Febo et al., 2020). En paralelo, resultados de nuestro laboratorio muestran una disminución en la conectividad en ratas de 18 y 24 meses en la corteza frontal de asociación con el cíngulo y la corteza retrosplenial respectivamente (Nava-Gómez et al., 2022).

2.2.2 Los receptores NMDA durante el envejecimiento

Uno de los receptores más importantes para las funciones cognitivas son los receptores NMDA. Durante el envejecimiento se ha observado una disminución de la transmisión sináptica mediada por estos receptores que se asocia con déficits cognitivos (Kumar, 2015; Magnusson, 2012). Los receptores NMDA son receptores glutamatérgicos ionotrópicos compuestos por las subunidades NR1 y NR2A-D. (Llansola et al., 2005). Las subunidades NR2 forman un canal iónico permeable a Ca^{+2} , pero que, en estado de reposo se encuentra bloqueado el poro del canal por un Mg^{+2} . Para la activación de los receptores a NMDA, es necesario la unión del glutamato en la subunidad NR2 y de su co-agonista en la subunidad NR1, además de una despolarización simultánea de la membrana para remover al Mg^{+2} (Strong et al., 2014).

En el 2012, Papouin y colaboradores demostraron que es la D-serina y no la glicina, el principal co-agonista de los receptores NMDA sinápticos, los cuales se relacionan con la plasticidad mientras que la glicina es el co-agonista principal en los receptores extra sinápticos. Los receptores NMDA también son necesarios para la transmisión sináptica y distintos tipos de plasticidad sináptica, como son la potenciación a largo plazo (LTP por

sus siglas en inglés) y la depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés). Es así como, en rebanadas de hipocampo, se ha observado que la degradación de D-serina reduce significativamente las corrientes de los receptores NMDA. Esta disminución se revierte con la administración de D-serina exógena (Mothet et al., 2000; Papouin et al., 2012).

2.2.3 Fisiología, metabolismo y papel de la D-serina en el envejecimiento

2.2.3.1 Síntesis y degradación de la D-serina

La D-serina es un aminoácido presente en el sistema nervioso central de mamíferos, en donde es esencial para la transmisión sináptica excitatoria mediado por receptores NMDA que participa en diversas funciones cognitivas que dependen del funcionamiento de este receptor (Wolosker, 2009). La D-serina se sintetiza de manera endógena a partir de la L-serina por acción de la serina racemasa (SR), la cual también cataliza la α - β eliminación de la D-serina o L-serina para producir piruvato y amoníaco (Figura 2A) (Wolosker et al., 1999). La degradación de la D-serina se debe principalmente a la acción de la enzima D-aminoácido oxidasa (DAAO) (Sacci et al., 2013). Ambas enzimas se encuentran tanto en el sistema nervioso central como en la periferia. La expresión de la SR en el cerebro se localiza principalmente en la corteza prefrontal, hipocampo, amígdala y en el cuerpo estriado y por ende las mayores concentraciones de D-serina (Figura 2B) (Horio et al., 2011; Schell et al., 1995; Wolosker et al., 1999).

La SR se expresa en distintas células del SNC como son neuronas, astrocitos y microglía entre otras. La aportación de cada una de estas células en los niveles de D-serina es aún controversial y parece que depende del área cerebral, del estado del desarrollo y del estado de inflamación del cerebro (Beltran et al., 2018). En el cerebro, la expresión de la DAAO se encuentra de manera importante en el cerebelo y el tallo cerebral. En estructuras frontales se ha observado que la SR también es la encargada de la degradación de la D-serina (Horiike et al., 1994; Horio et al., 2011; Verral et al., 2007).

En paralelo a la síntesis endógena de la D-serina, esta se puede absorber cuando es administrada por vía oral. La D-serina entra en las células de la mucosa intestinal mediante el transportador ATB0+ y de ahí es liberada al torrente sanguíneo utilizando el sistema de transportadores L1 y ASC-1 (Figura 2C). En el torrente sanguíneo la D-serina es capaz de viajar al cerebro y atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) mediante transportadores como ASCT1 y ASCT2 presentes en las células parenquimáticas de la BHE (Kasai et al., 2011; Pernot et al., 2012).

2.2.3.2 La D-serina en el envejecimiento

Las concentraciones de D-serina fluctúan a lo largo de la vida. En etapas tempranas, un incremento de la D-serina se relaciona con el desarrollo cerebral mientras que los déficits en la concentración se relacionan con alteraciones en el desarrollo del cerebro (Fuch et al., 2006). En estas etapas, la D-serina contribuye en la sinaptogénesis y en el desarrollo de las dendritas neuronales (Balu & Coyle, 2012; Diniz et al., 2012).

Durante el envejecimiento se ha observado una disminución en la expresión de la SR y de la concentración de la D-serina, la cual se ha asociado al estrés oxidativo y a un aumento en las especies reactivas de oxígeno en el hipocampo (Billard, 2013, 2015; Haxaire et al., 2012). A la par, se ha reportado que hay una disminución en la activación de los receptores NMDA en rebanadas de la corteza prefrontal en ratas envejecidas (25-29 meses). Estas ratas además mostraron una reducción en la LTP, en comparación con ratas jóvenes (2-6 meses). Esta disminución dependía de los niveles de D-serina, ya que la administración exógena de este aminoácido incrementó la magnitud de la LTP haciéndola comparable con las ratas jóvenes (Junjaud et al., 2006; Turpin et al., 2011).

Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que las alteraciones en la señalización de los receptores NMDA se explicaran por una disminución en la concentración cerebral de la

D-serina y que resultara en la disminución de diversas funciones cognitivas (Billard, 2013, 2015; Turpin et al., 2011).

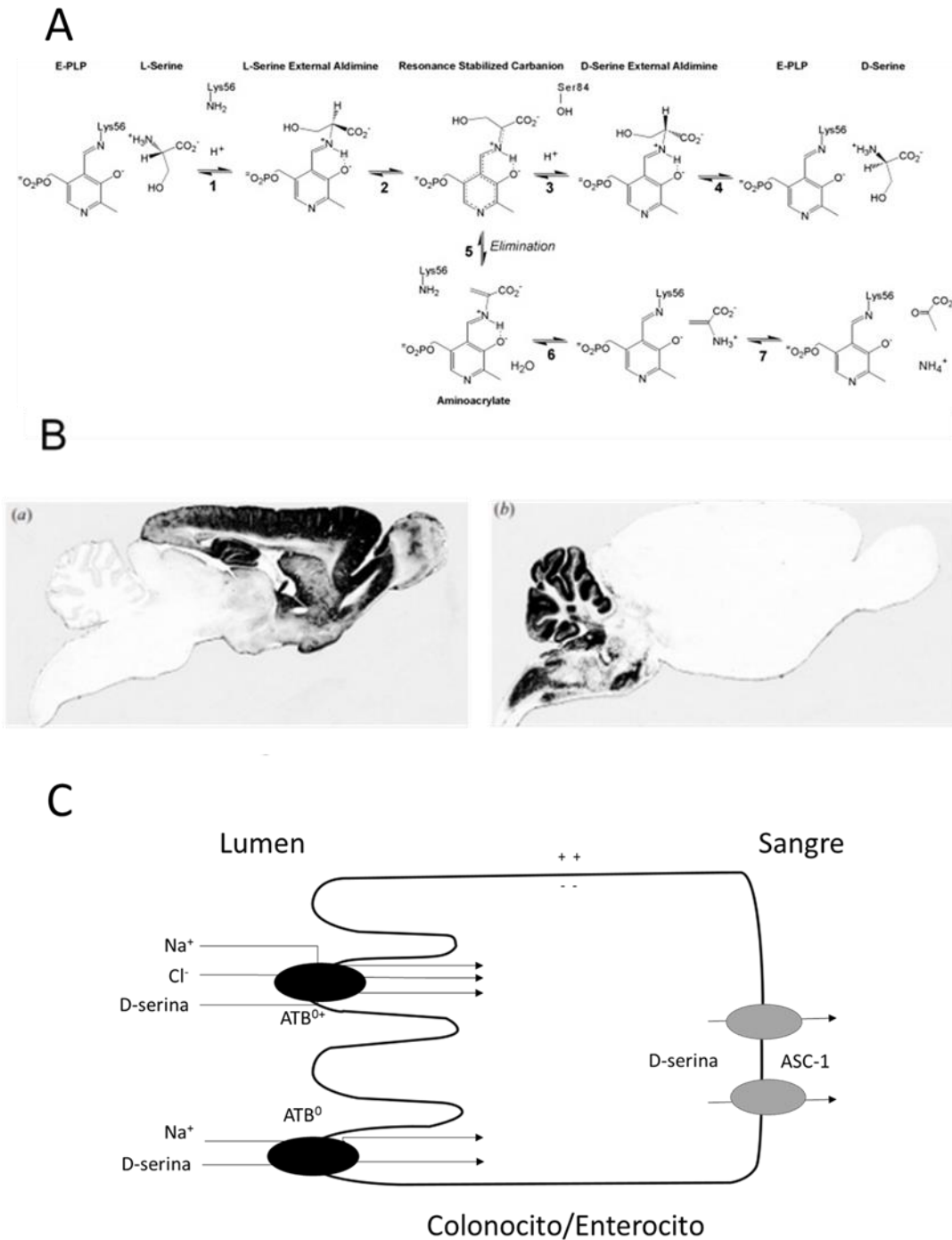


Figura 2. Metabolismo de la serina racemasa, localización y modelo de absorción de la D-serina. A. La D-serina puede ser sintetizada a partir de la L-serina por acción de la enzima serina racemasa. También puede ser degradada a través de la α,β eliminación teniendo como producto piruvato y amoníaco (Modificado de Wolosker, 2011). B. Localización de la D-serina endógena a

la izquierda y de la DAAO (D-aminoácido oxidasa) a la derecha en el cerebro de rata adulta. (Modificada de Schell, 2004). C. Modelo de la absorción intestinal de la D-serina. La D-serina exógena es capaz de ingresar al organismo debido a la expresión de los receptores ATB⁰ en los enterocitos de las ratas y humanos (Modificado de Hatanaka et al., 2002).

2.2.4 Participación del receptor NMDA en la flexibilidad cognitiva

En la vida estamos expuestos a distintos cambios y la capacidad de poder adaptarse a estos es de suma importancia para la supervivencia. Esta habilidad de adaptación se puede entender como flexibilidad cognitiva, la cual es la capacidad de ajustar adecuadamente el comportamiento de acuerdo con un entorno cambiante (Hamilton y Brigman, 2015). La flexibilidad cognitiva a menudo se mide utilizando un paradigma de aprendizaje reverso, en el que los sujetos deben de suprimir una respuesta a una asociación previamente establecida y configurar una nueva en función de la retroalimentación (Izquierdo et al., 2017a). Un desempeño alterado de la flexibilidad cognitiva se ha asociado con distintos desordenes como el trastorno obsesivo compulsivo, la esquizofrenia, el trastorno del espectro autista entre otros (Dajani & Uddin, 2015; Floresco et al., 2009).

Algunas de las estructuras cerebrales que se relacionan con la flexibilidad cognitiva son la corteza prefrontal medial, la corteza orbito frontal, la corteza cingulada anterior dorsal, la ínsula anterior, así como otras estructuras subcorticales y límbicas importantes para la detección de estímulos relevantes. Además del estriado dorsal y el núcleo accumbens (Donegan et al., 2014; Hamilton y Brigman, 2015; Clarke et al., 2008; Darvas & Palmiter, 2015; Ding et al., 2014).

Los receptores NMDA tienen un papel fundamental en la flexibilidad cognitiva. La administración de antagonistas del receptor NMDA como la deleción de una de sus subunidades produce una disminución en el desempeño de los roedores en pruebas de flexibilidad cognitiva (Abdul-Monim et al., 2003; Clark et al., 2017; Dalton et al., 2011; Darvas y Palmiter., 2015; Ding et al., 2014; Duffy et al., 2008; Marquardt et al., 2019). Al

igual que ocurre con otras funciones, durante el envejecimiento, existe un declive de la flexibilidad cognitiva que se puede asociar con una inhabilidad de adaptarse a situaciones nuevas (Boone et al., 1993; Moore et al., 2006; Magnusson, 2014). En roedores, existe también una disminución en la flexibilidad cognitiva la cual se asocia a cambios en la corteza prefrontal, así como con una disminución de la expresión de los receptores NMDA, de receptores de kainato y con deterioro en la función dopaminérgica (Bizon et al., 2012; Magnusson & Brim, 2014; Mizoguchi et al., 2010; Nava-Gómez, Calero Vargas et al., 2022; Schoenbaum et al., 2006). Resultados previos de nuestro laboratorio analizaron la participación de la D-serina como mediador de la hipofunción de los receptores NMDA que pudieran asociarse con las deficiencias en la flexibilidad cognitiva asociados al envejecimiento. En este trabajo, encontramos que las ratas de 12, 18 y 24 meses tenían una disminución en la flexibilidad cognitiva, en comparación con ratas jóvenes (6 meses), y que la suplementación crónica de D-serina (por 60 días), revertía los déficits en la flexibilidad cognitiva. Más aún, la suplementación de D-serina restaura la conectividad funcional entre estructuras cerebrales relevantes para la flexibilidad cognitiva (Corteza Frontal de Asociación y Corteza Retroesplénica, y la Corteza Frontal de Asociación y el Cíngulo) que se ve afectada con el envejecimiento (Nava-Gómez, Calero Vargas et al., 2022).

2.2.5 Reserva, mantenimiento y compensación: mecanismos para afrontar el declive cognitivo

Una de las principales características del envejecimiento es una disminución en el desempeño en distintas funciones cognitivas. Pero este declive no se presenta de manera homogénea entre todos los individuos, existiendo personas con mayor resiliencia que otras ante los efectos perjudiciales del envejecimiento. Estas diferencias se han adjudicado a factores tanto genéticos como ambientales que pueden estudiarse a distintos niveles. Algunos términos que se han acuñado para entender estas diferencias son reserva, mantenimiento y compensación. Estos términos buscan describir las diferencias en la estructura cerebral y sus funciones. Sin embargo, se han usado de

manera inconsistente y no se ha llegado a un consenso definitivo (Cabeza et al., 2018; Stern et al., 2021).

La reserva se puede definir como el acumulamiento de recursos neuronales a lo largo de la vida, debido a factores genéticos o ambientales, que mitigan los efectos del deterioro neuronal causado por el envejecimiento. Los recursos neuronales se refieren a los recursos anatómicos y fisiológicos del cerebro que median los procesos cognitivos. Estos recursos neuronales pueden ser muy diversos como el volumen de materia gris, la mielinización de los tractos, la función de una región o el funcionamiento de una red cerebral evaluada mediante métodos de conectividad funcional entre otros (Cabeza et al., 2018). Esta reserva se forma a lo largo de la vida y es el resultado de la combinación de diversos determinantes como actividades cognitivas estimulantes, nivel de educación, dieta y actividad física entre otros. De modo que individuos con una reserva cognitiva mayor pueden presentar un retraso en la aparición de los síntomas relacionados con la disfunción cognitiva asociados al envejecimiento (Serra et al., 2018; Stern., 2017). Un ejemplo de mecanismos que favorecen la reserva cognitiva podría ser los niveles de educación o de IQ que se han asociado con diferencias en la actividad cerebral durante evaluaciones cognitivas en pruebas de resonancia magnética funcional (Anthony & Lin, 2017).

El mantenimiento es otro concepto que busca explicar las diferencias entre individuos durante el envejecimiento en donde se preservan estos recursos neurales (Cabeza et al., 2018) y que requiere de distintos mecanismos neuronales de reparación y de plasticidad. La reserva y el mantenimiento están relacionados, pero presentan diferencias, la reserva busca aumentar los recursos neuronales más allá de los niveles actuales mientras que el mantenimiento busca regresar a los niveles previos más altos. En estudios longitudinales se ha observado que adultos mayores que presentan un mejor desempeño en pruebas de memoria episódica también presentan un mayor volumen en estructuras como el hipocampo comparado con aquellas con un bajo desempeño. De igual manera, el cerebro y la conectividad funcional de sujetos envejecidos con mayor desempeño es más similar

a los de personas jóvenes que los de adultos mayores con un desempeño pobre (Gorbach et al., 2017; Pudas et al., 2013).

El termino compensación se refiere a que, ante el aumento en la demanda cognitiva o alguna insuficiencia entre los recursos neuronales, se compensan estas deficiencias mediante el reclutamiento de recursos neuronales (Cabeza et al., 2018). Algunos ejemplos de compensación podrían ser un aumento en la actividad neuronal o el reclutamiento de circuitos neuronales que en condiciones fisiológicas ideales no se utilizarían (Daselaa et al., 2006; Reuter-Lorenz & Cappell, 2008). En términos generales se puede entender a la reserva cognitiva como la cantidad de recursos neuronales con los que contamos, y el mantenimiento a que tan bien preservamos estos recursos y la compensación en cómo y cuándo los usamos.

El estudio de la reserva cognitiva en animales se ha incrementado en los últimos años. La determinación y cuantificación de esta reserva se basa principalmente en el desempeño en distintas pruebas conductuales, las cuales se realizan en condiciones altamente controladas y se pueden aplicar repetidamente durante la vida. En los humanos, se pueden utilizar medidas indirectas o proxis para la evaluación de la reserva como el número de años de escolaridad, el tipo de empleo en el que se desarrolla y la participación en actividades estimulantes (Sole-Padulles, 2015; Serra et al., 2018), mientras que en animales se pueden establecer proxis similares para estudios longitudinales lo que nos permite observar cambios durante toda la vida del sujeto. Algunos ejemplos de análisis que nos permiten ver el impacto de intervenciones a largo plazo en un tiempo relativamente corto son las intervenciones farmacológicas, la medida de los niveles de actividad física, así como el desempeño en pruebas cognitivas repetidas y enriquecimiento social y ambiental.

Una de las intervenciones más estudiadas es la del ambiente enriquecido, en donde el hábitat donde se encuentran los animales presenta modificaciones como por ejemplo

jaulas más grandes, más número de animales, ruedas de ejercicios y distintos tipos de juguetes (Zeleznikow-Johnston et al., 2017). Roedores envejecidos que han sido expuestos a este ambiente presentan mejor desempeño conductual en distintos tipos de paradigmas conductuales (Garthe et al., 2016; Harburger et al., 2007; Sampedro-Piquero et al., 2013; Zeleznikow-Johnston et al., 2017). Aunado a esto, los animales expuestos al ambiente enriquecido presentan cambios plásticos como un aumento en la neurogénesis, densidad de espinas dendríticas y en la complejidad de los árboles dendríticos, lo cual podría revertir los cambios relacionados con la edad en la depresión a largo plazo (LTD) y la potenciación a largo plazo (LTP) (Freret et al., 2012; Garthe et al., 2016; Gelfo et al., 2011; Kolb et al., 2003; Kumar et al., 2012). De igual manera, este ambiente enriquecido tiene efectos sobre los astrocitos de ratas envejecidas los cuales presentan una mayor complejidad morfológica y se encuentran en mayor número debido a un incremento en su proliferación (Sampedro-Piquero et al., 2014).

En este sentido, el presente proyecto pretende estudiar el efecto de la D-serina sobre la flexibilidad cognitiva facilitada por la reserva cognitiva mediante el uso de pruebas conductuales y la conectividad funcional cerebral cuantificada por la resonancia magnética funcional en estado de reposo.

3. Hipótesis

La suplementación con D-serina mejorará el desempeño de las ratas de 18 meses en una reevaluación de la flexibilidad cognitiva asociada a los cambios en la conectividad funcional.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

Analizar los efectos de la suplementación de D-serina en una reevaluación la flexibilidad cognitiva en ratas de 18 meses.

4.2 Objetivos específicos:

1- Caracterizar la flexibilidad cognitiva en ratas de 12 meses.

2- Caracterizar la conectividad funcional en ratas de 12 meses.

3- Caracterizar el efecto de la D-serina en ratas de 18 meses de edad en una reevaluación de la flexibilidad cognitiva.

4- Caracterizar el efecto de la D-serina sobre la conectividad funcional en ratas de 18 meses.

5- Caracterizar el efecto de evaluaciones repetidas a los 24 meses

6- Caracterizar el efecto de la D-serina administrada a los 24 meses en la conectividad funcional

5. Metodología

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales. El número del protocolo del proyecto aprobado es: No. 116.A.

5.1 Animales

Se utilizaron 46 ratas macho de la cepa Wistar de 12 meses de edad, con un peso entre 350- 400 g, las cuales fueron obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la evaluación de la flexibilidad cognitiva, las ratas fueron mantenidas en la Unidad De Análisis Conductual del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla. Las ratas fueron alojadas de manera individual en cajas de 48X25 cm con agua ad libitum y alimento controlado a un 85% de su ingesta habitual para mantener su peso. Se mantuvieron en un ciclo 12 horas luz/12 horas oscuridad.

5.2 Suplementación de D-serina

Se suplementó D-serina (300 mg/kg, Sigma-Aldrich Co S4250) diariamente en el agua de beber por dos meses (de los 16 a los 18 meses) ya que estudios previos del laboratorio han mostrado que tiene un efecto positivo en la flexibilidad cognitiva de las ratas envejecidas (Nava-Gómez, Calero-Vargas, et al., 2022). La D-serina se preparó diariamente y se ajustó la dosis al peso diario de las ratas.

5.3 Tarea de aprendizaje inverso

5.3.1 Equipo

Se utilizaron cajas de condicionamiento operante con paredes y techo de plexiglás, y piso metálico con las siguientes medidas 29x24x29 cm. La pared frontal contó con dos palancas retractiles, dos luces LED por encima de las palancas y un comedero entre ambas palancas (Figura 3B). Las cajas fueron controladas con Arduinos y rutinas construidas en visual basic.

5.3.2 Entrenamiento

Las ratas se entrenaron siguiendo fases progresivas a los 12 meses (Figura 3A). En la fase 1, el objetivo es que la rata aprenda a asociar la palanca con una recompensa y determinar la palanca preferente. Durante este tiempo, las 2 palancas permanecieron extendidas y al momento de presionar cualquiera de las dos palancas la rata obtenía una recompensa (un pellet). La sesión se dio por concluida cuando la rata presionaba 50 veces la palanca o si permanecía 30 minutos en la caja. Se estableció como lado preferente aquella palanca que la rata presionó al menos un 70% de las veces durante las sesiones. En la Fase 2, la rata debía aprender a asociar la presión de las palancas con los estímulos luminosos. En este caso, las dos palancas se extienden de manera simultánea y tres segundos después, se encendía un estímulo luminoso ipsilateral del lado preferente de la rata. El estímulo luminoso y la palanca permanecían extendidas por un tiempo máximo de 10 segundos o hasta que la rata accionará cualquiera de las dos palancas. Si la rata presionaba cualquiera de las dos palancas antes que apareciera el estímulo luminoso, ambas palancas se retraían sin proveer de recompensa a la rata. Si la rata presionaba la palanca ipsilateral al estímulo luminoso, se obtenía una recompensa. La duración de la sesión fue de 30 minutos. Se realizó una sesión al día por 21 días (Figura 3C).

5.3.3 Evaluación de la flexibilidad cognitiva

Cuando las ratas alcanzaron un 70% de aciertos en la Fase 2, se procedió a evaluar la flexibilidad cognitiva. Esta prueba consistió en una única sesión de 30 minutos en las que se encendió un estímulo luminoso en el lado preferente de la rata (como en la fase 2), sin embargo, si la rata presionaba la palanca ipsilateral a la luz esta vez, no recibía ninguna recompensa. Durante esta sesión, la presión de la palanca ipsilateral al estímulo luminoso se contabilizó como una perseveración (Figura 3C). El número de perseveraciones se consideró como una medida inversa a la flexibilidad cognitiva

5.3.4 Reentrenamiento

Una vez evaluada la flexibilidad cognitiva, las ratas fueron asignadas en 2 grupos, control y D-serina, dependiendo de su desempeño en esta tarea. Las ratas fueron suplementadas con D-serina por un mes (a los 17 meses de edad) previo al inicio del reentrenamiento y continuaron la suplementación hasta cumplir los 2 meses. Durante este tiempo, las ratas se reentrenaron en la tarea hasta alcanzar otra vez el criterio (13 sesiones) y se volvió a evaluar la flexibilidad cognitiva a los 18 meses. La suplementación de D-serina se suspendió 24h antes de la evaluación de la flexibilidad cognitiva. Las ratas pasaron por un tercer reentrenamiento y evaluación a los 24 meses para lo cual se requirió un reentrenamiento de la tarea de 13 sesiones para que volvieran a alcanzar el 70% de los aciertos (Figura 3D). Para el análisis de datos las ratas fueron divididas en dos grupos basándonos en su desempeño: aquellas con y sin un deterioro cognitivo. Para esta división nos basamos en el desempeño del grupo de ratas jóvenes (6 meses) (Nava-Gómez, Calero-Vargas et al., 2022). El grupo de ratas deterioradas fueron aquellas que presentaban un número de perseveraciones mayor que el promedio de ratas jóvenes, mientras que las de menor número de perseveraciones se categorizaron sin deterioro.

5.4 Resonancia Magnética funcional

La resonancia magnética funcional es una herramienta de gran utilidad para estudios longitudinales ya que nos permite estudiar cambios en la conectividad cerebral funcional. Durante el envejecimiento existen cambios en la conectividad funcional entre distintas

estructuras (Nava-Gómez, Calero-Vargas et al., 2022). Posterior a las evaluaciones de flexibilidad cognitiva (12, 18 y 24 meses) las ratas fueron llevadas al resonador para la adquisición de imágenes anatómicas y funcionales por medio de resonancia magnética.

5.4.1 Adquisición de imágenes estructurales y funcionales

Se utilizó un resonador de 7 teslas para pequeñas especies (Bruker BioSpin Pharmascan® 70/16US). Brevemente, los animales fueron anestesiados en una cámara de acrílico con oxígeno y 5% de isoflurano por 5 minutos. Posteriormente se les inyectó una dosis de 0.0015 mg/kg de Dexmedetomidina de manera subcutánea (Dexdomitor®) y se les regresó a la caja de acrílico con isoflurano al 1%, en donde se mantuvieron por 10 minutos. La rata se colocó en una antena de 4 canales con calefacción para realizar el estudio de IRM. Las ratas fueron mantenidas con isoflurano (0.5%), oxígeno y con temperatura controlada durante la adquisición de las imágenes. Se monitorearon los signos vitales (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y saturación parcial de oxígeno) para un mejor control del estado de anestesia del animal. Se utilizó una secuencia de rápida adquisición de spin-echo (Turbo -RARE) con los siguientes parámetros: TR (tiempo de repetición) = 4213 ms, TE (tiempo de echo) = 33 184 ms, RARE factor = 16, campo de visión (FOV por sus siglas en inglés) = 30 x 30 mm²; matriz de adquisición de 144 x 160 y un grosor de rebanada de 1 mm. Para el análisis de conectividad funcional evaluada en estado de reposo, se utilizó un eco de gradiente en una secuencia ecoplanar (FID-EPI) con los siguientes parámetros: TR (tiempo de repetición) = 1000 ms, TE (tiempo de echo) = 20 ms, campo de visión (FOV por sus siglas en inglés) = 30 x 30 mm²; matriz de adquisición de 144 x 160 y un grosor de rebanada de 1 mm.

5.4.2 Preprocesamiento

Para el preprocesamiento se utilizó FSL v5.0.9. library. Los primeros 5 volúmenes de cada serie funcional fueron descartados. Posteriormente se realizó una corrección de movimiento y slice timing correction utilizando como referencia el primer volumen que no

se descartó. Se realizó un filtrado temporal pasa altas con frecuencias entre 0.01 y 0.1 Hz. Posteriormente se llevó a cabo un suavizado espacial con un FWHM de 1 mm.

5.4.3 Análisis

Posterior al preprocesamiento de las imágenes, se llevó a cabo un análisis con el objetivo de identificar las redes cerebrales que tuvieran conexiones funcionales asociadas con la edad. Para esto, utilizamos el programa Network-based Statistics (NBS) (Zalesky, et al., 2010). Para identificar las redes que tuvieran cambios significativos, se seleccionaron 5 estructuras cerebrales como regiones de interés (ROIs) las cuales se han visto involucradas en pruebas de flexibilidad cognitiva (Beas et al., 2017; Dajani & Uddin, 2015; Izquierdo et al., 2017; Nieves-Martinez et al., 2012; Schoenbaum et al., 2007) que incluyen el estriado, la ínsula, la corteza frontal de asociación, la corteza dorsolateral orbital, y la corteza retrosplenial.

Con el NBS se puede estimar la significancia estadística de un conjunto de conexiones comparando su fuerza (la suma de su peso estadístico) con la de una distribución nula estimada con permutaciones del dato original. Posteriormente se realizaron pruebas estadísticas para identificar clústeres de conexiones para estudiar el efecto de la edad y la suplementación de D-serina.

5.5 Pruebas estadísticas

La información fue procesada y graficada utilizando el programa GraphPad Prisma. Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizó un análisis estadístico para datos paramétricos utilizando la prueba ANOVA (post hoc: Tukey) y la prueba T y para datos no paramétricos se utilizó una prueba de U de Mann-Whitney Y ANOVA no paramétricos (Kruskal-Wallis test, post hoc: Dunne). Para todas las comparaciones se tomó $p < 0.05$ como significativo.

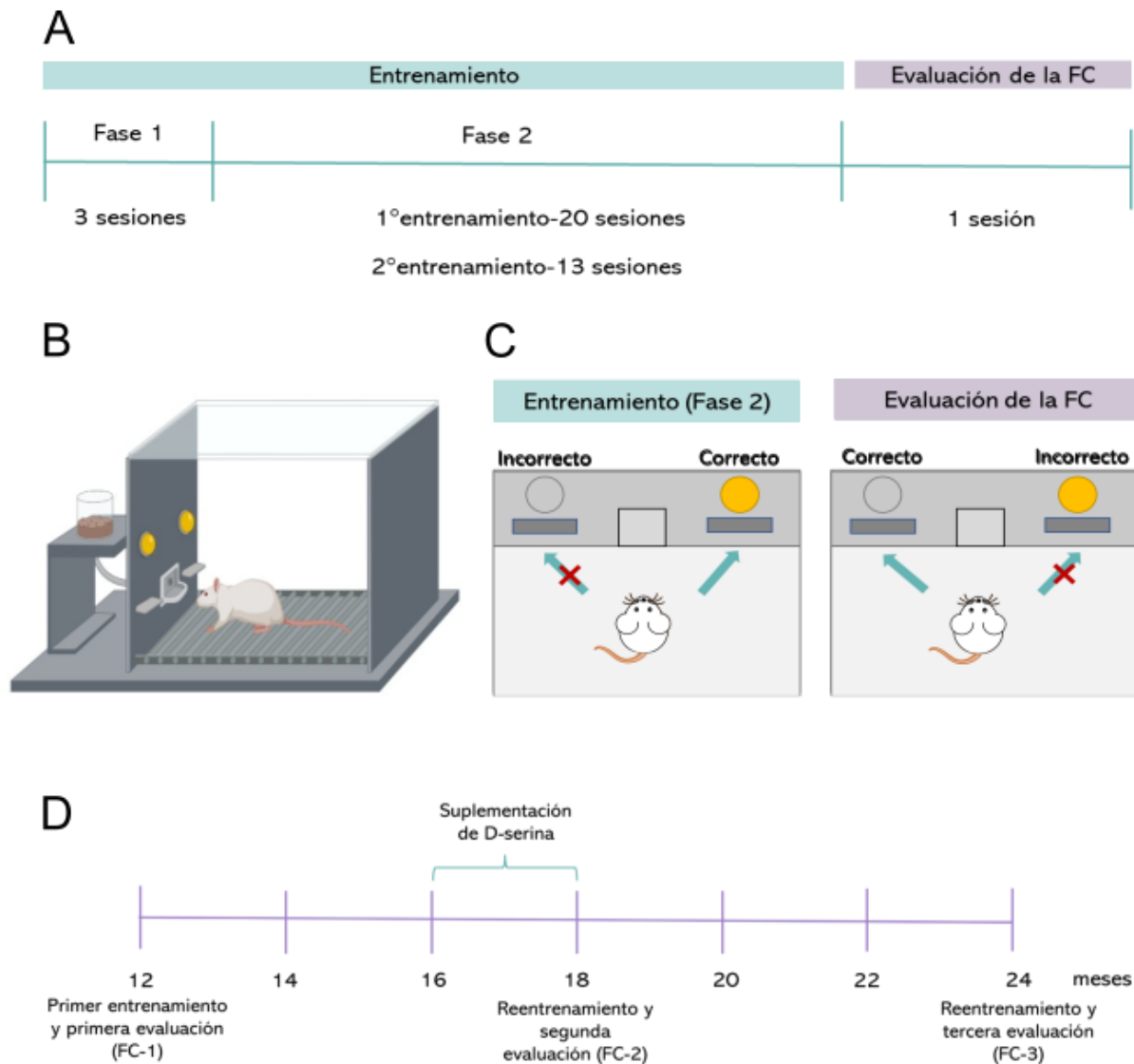


Figura 3. Diseño experimental. A. Línea del tiempo de la tarea de aprendizaje reverso. B. Diagrama de la caja de condicionamiento utilizada para esta tarea. C. Esquema que ejemplifica la Fase 2 del entrenamiento y en esta fase, la rata recibe la recompensa si presiona la palanca ipsilateral a la luz y durante la evaluación de la flexibilidad cognitiva la rata recibe la recompensa si presiona la palanca contralateral a la luz. D. Línea del tiempo del experimento en donde se muestran las intervenciones. FC: Evaluación de la flexibilidad cognitiva.

6. Resultados

6.1 La flexibilidad cognitiva mejora con una previa evaluación

Las ratas de 11 meses de edad fueron entrenadas por 20 sesiones (una por día) en una tarea de condicionamiento operante para la posterior evaluación de la flexibilidad cognitiva. Se contabilizó el número de aciertos por sesión (presión de la palanca ipsilateral en respuesta a la luz) los datos mostraron que las ratas alcanzaron el criterio en la Sesión 9 y que a partir de este momento se empezó a formar una meseta (Figura 4A).

Una vez que las ratas habían aprendido la tarea, se evaluó la flexibilidad cognitiva en una única sesión de 30 minutos con el inverso del número de perseveraciones (el número de veces que las ratas presionaron la palanca ipsilateral a la luz). Se contabilizaron las perseveraciones realizadas a partir de los 10 minutos (Figura 4C y D) ya que estudios previos en el laboratorio han mostrado que grupos de distintas edades (6, 12 y 18 meses de edad) presentan un comportamiento similar los primeros 10 minutos (Nava-Gómez & Calero-Vargas et al., 2022). Se observó que las ratas de 12 meses presentaron un promedio de 78.23 ± 5.050 perseveraciones. Posterior a esto, se asignaron las ratas en dos grupos, control y D-serina, de acuerdo con su desempeño en la tarea de flexibilidad cognitiva, de tal manera que los grupos tuvieran un balance en la heterogeneidad de desempeños. Estas ratas volvieron a ser entrenadas (a los 17 meses) en la misma tarea alcanzando el ~70% de palanqueos correctos en la Sesión 4 (6 días más rápido que el primer entrenamiento, Fig. 4B). El grupo suplementado con D-serina recibió este aminoácido en el agua de beber ~40 días antes de iniciar el reentrenamiento de tal manera que fueran suplementadas durante 2 meses antes del día de la evaluación de la flexibilidad cognitiva.

Se compararon ambas sesiones a los 12 (FC-1) y 18 meses (FC-2) tanto del grupo control (Figura 4 C y E) como del grupo tratado con D-serina (Figura 4 D y F). Como se puede observar, en ambos grupos el número de perseveraciones va disminuyendo durante la

sesión (Figura 4 C y D) (Control 10-15 min: U de Mann Whitney=90.50, $p=0.0235$; 25-30 min: U de Mann Whitney=89, $p=0.0051$. D-serina 10-15 min: U de Mann Whitney=164, $p=0.0271$, 15-20 min U de Mann Whitney=147.5, $p=0.0095$, 20-25 min U de Mann Whitney=137.5, $p=0.0047$, 25-30 min U de Mann Whitney=144.5 $p=0.0040$). Las ratas de ambos grupos se comportaron de manera similar los primeros 10 minutos en la primera sesión en comparación con la segunda. Sin embargo, tanto las ratas suplementadas con D-serina como los controles presentaron una disminución significativa del número total de perseveraciones en la segunda evaluación en comparación con la primera (Figura 4C y D) ((Control: t test (27) =5.092, $p < 0.0001$; D-serina: Wilcoxon test $Z=2.128$, $p=0.0005$, (t (55) =0.5656, $p=0.5740$)). Al comparar el número de perseveraciones las ratas tratadas y control durante la segunda evaluación, no mostraron diferencias significativas entre grupos (Figura 4G) (t (55) =0.5656, $p=0.5740$).

Con el fin de analizar el efecto longitudinal del entrenamiento en la tarea de aprendizaje inverso sobre la flexibilidad cognitiva, comparamos los datos de las ratas a los 18 meses (FC-2) tanto control como D-serina, con resultados previos del laboratorio (transversales) de 6, 18 meses control y 18 meses suplementadas con D-serina. Como se puede observar (Figura 5A), las ratas de 12 y 18 meses presentan un mayor número de perseveraciones en comparación con las ratas jóvenes (6 y 12 meses U de Mann Whitney=569.5 $p=0.0047$; 6 y 18 meses t (61) =4.695, $p < 0.0001$). Sin embargo, el número de perseveraciones disminuyó en las ratas de 18 meses que recibieron crónicamente D-serina y en los grupos FC-2 (control y D-serina) que recibieron un entrenamiento previo a los 12 meses, haciendo los tres grupos comparables con ratas jóvenes. Es decir, el entrenamiento de las ratas a los 12 meses de edad revirtió el deterioro en la flexibilidad cognitiva de las ratas evaluadas a los 18 meses sin cambios.

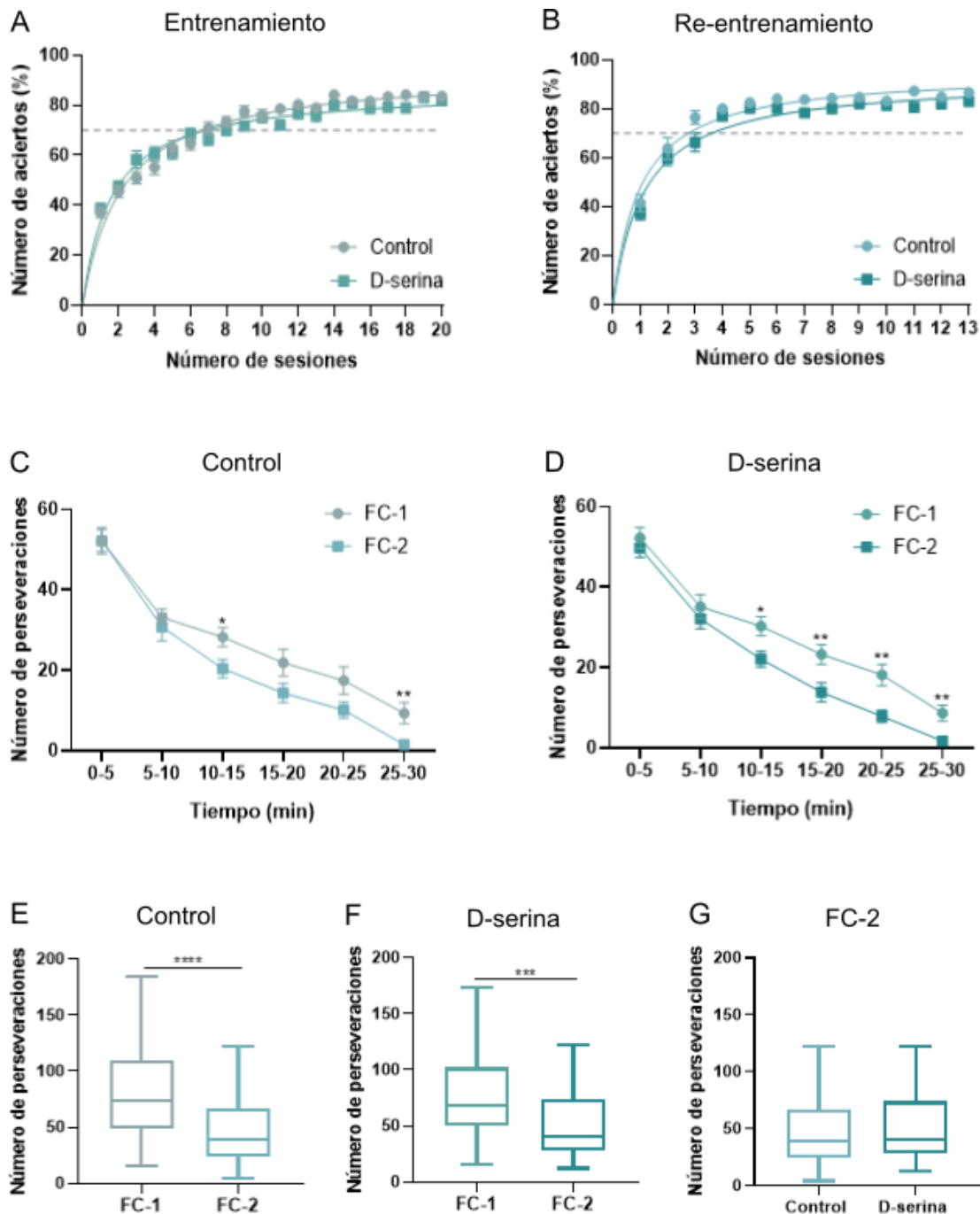


Figura 4. Experiencia previa en la tarea mejora el desempeño en una prueba de flexibilidad cognitiva. Curvas de adquisición de la tarea en una caja de condicionamiento operante. Las ratas fueron entrenadas para presionar la palanca ipsilateral a la luz (número de aciertos). A. Curva de adquisición de la tarea del primer entrenamiento, se representa el promedio del porcentaje de aciertos con error estándar la línea punteada representa el 70% del promedio de aciertos (n=64). B. Curva de adquisición de la tarea del reentrenamiento se representa el promedio del porcentaje de aciertos con error estándar (n=63). C. Promedio de de perseveraciones a través de la sesión del control con error estándar (n= 29). D. Promedio de perseveraciones a través de la sesión de

las ratas tratadas con D-serina con error estándar (n=34). E. Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones realizadas de las ratas control de la primera y segunda evaluación de flexibilidad cognitiva (n= 29). F. Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones realizadas de las ratas suplementadas con D-serina de la primera y segunda evaluación de flexibilidad cognitiva. G. Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones realizadas de las ratas control y tratadas durante la segunda evaluación (t- test). FC1: Primera evaluación la flexibilidad cognitiva, FC2: Segunda evaluación la flexibilidad cognitiva. Prueba t pareadas y no pareadas * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

Nos cuestionamos cómo había cambiado la flexibilidad cognitiva de las ratas en la segunda evaluación en relación con la primera. El 90% de las ratas del grupo control mejoraron su desempeño, sin embargo, solo el 74% de las ratas suplementadas con D-serina mejoraron el desempeño en la segunda evaluación (Figura 5B). Nos preguntamos entonces si el efecto de la D-serina dependía del desempeño inicial de las ratas (a los 12 meses). Para responder esto, clasificamos a las ratas con base en el desempeño en la primera evaluación en ratas sin deterioro (aquellas que no presentaban una mejoría en el desempeño de la flexibilidad cognitiva en comparación con las jóvenes) y con deterioro (ratas que mostraban una disminución en la flexibilidad cognitiva asociadas al envejecimiento).

Las ratas control con y sin deterioro en esta tarea, mejoraron la flexibilidad cognitiva al igual que las ratas con deterioro que recibieron D-serina. Sin embargo, las ratas sin deterioro suplementadas con D-serina tuvieron una disminución en la flexibilidad cognitiva cuando se evaluaron a los 18 meses (ANOVA $F(3,58) = 13.52$, $p < 0.0001$, post hoc Tukey Sin deterioro + D-ser vs Sin deterioro control $p = 0.0072$, Sin deterioro + D-ser vs Con deterioro control $p < 0.0001$, Sin deterioro + D-ser vs Con deterioro + D-ser $p < 0.0001$, ANOVA $F(3,58) = 13.52$, $p < 0.0001$, post hoc Tukey) (Figura 5C).

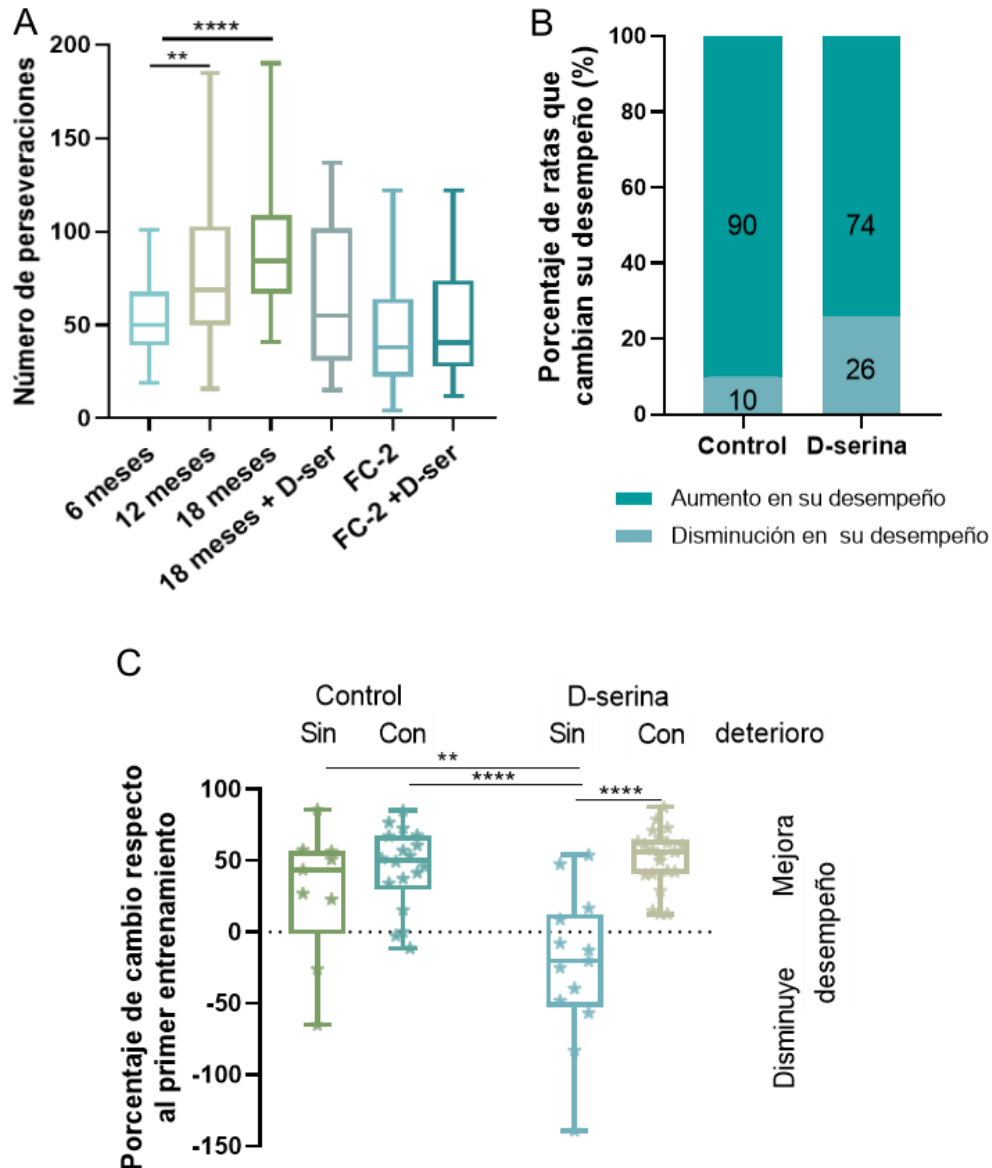


Figura 5. El efecto de la D-serina en una segunda evaluación de la flexibilidad cognitiva depende del estado inicial de la rata A. . Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones realizadas de las ratas de 6 meses (n=28), 12 meses (n=65), 18 meses control (n=35), 18 meses suplementadas con D-serina (n=12, grupo transversal) y de 18 meses con una previa evaluación: FC-2 (Control) (n=31) y FC2 + D-ser (Suplementadas con D-serina) (n=34). B. Porcentaje de ratas que mejoran o que empeoran en la segunda evaluación del a flexibilidad cognitiva. C Porcentaje de cambio en el desempeño de la flexibilidad cognitiva en las ratas con buen y mal desempeño en las ratas del grupo control y suplementadas con D-serina. La línea punteada indica que no hubo cambio. Los números negativos indican que la flexibilidad cognitiva disminuyo en comparación con el desempeño a los 12 meses. (Control sin deterioro n=10, Control con deterioro n=18, Suplementadas con D-serina sin deterioro n=13; suplementadas con D-serina con deterioro n=21). ANOVA no paramétrico post hoc: dunne * p<0-05, **p<0.001, ****p<0.0001.

6.2 Reentrenamiento y reevaluación a los 24 meses

Posteriormente nos preguntamos la persistencia de estos cambios en edades más avanzadas. Para esto, volvimos a evaluar las ratas en la tarea del aprendizaje inverso así que reentrenamos a las ratas a los 24 meses de edad. Las ratas alcanzaron ~70% de palanqueos correctos en la Sesión 4 alcanzando la meseta de aprendizaje en la misma sesión que en el segundo entrenamiento (a los 18 meses) (Figura 6A). Posteriormente evaluamos la flexibilidad cognitiva. Las perseveraciones obtenidas entre la segunda (FC-2) y la tercera evaluación (FC-3) no mostraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el grupo control como el suplementado con D-serina a los 18 meses (Figura 6 B y C) (Control: U de Mann–Whitney = 189.5, $p= 0.6096$, D-serina: U de Mann–Whitney =243.5, $p= 0.8093$). Posteriormente se comparó el número de perseveraciones de la tercera evaluación y no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el de D-serina (Figura 6D) (U de Mann–Whitney = 105, $p= 0.564$).

Estudios previos del laboratorio muestran un deterioro de la flexibilidad cognitiva en las ratas de 24 meses que se refleja como un mayor número de perseveraciones que ratas jóvenes (Nava-Gómez J & Calero-Vargas I, et al., 2022). Al comparar los distintos grupos de 24 meses transversales (24 meses; 24 meses + D-serina) y los del estudio longitudinal FC3 (24 meses FC-3, 24 meses FC-3 + D-serina), con el grupo de 6 meses, se observaron diferencias significativas en las ratas de 24 meses del grupo transversal ($t(41) = 4.292$, $p=0.0001$), pero ninguna en comparación los grupos longitudinales control y D-serina (Kruskal-Wallis test $H(4) = 1.381$, $p=0.71$) (Figura 6E). Posteriormente nos preguntamos como habían cambiado los desempeños de las ratas entre la segunda y la tercera evaluación. De manera general, la proporción de ratas que disminuyó su desempeño es mayor que la proporción de ratas que mejora (Control 66 vs 37; D-serina 53 vs 47, respectivamente). Posterior a esto, comparamos el desempeño de las ratas a los 24 meses con su desempeño a los 18 meses utilizando la misma categorización en el desempeño de los 12 meses. Como se puede observar, no existe una disminución en el desempeño entre la segunda (18 meses) y la tercera evaluación (24 meses) tanto en el grupo control como los que fueron suplementados con D-serina a los 18 meses (Figura 6G) (Kruskal-Wallis test $H(4) = 1.303$, $p=0.7283$).

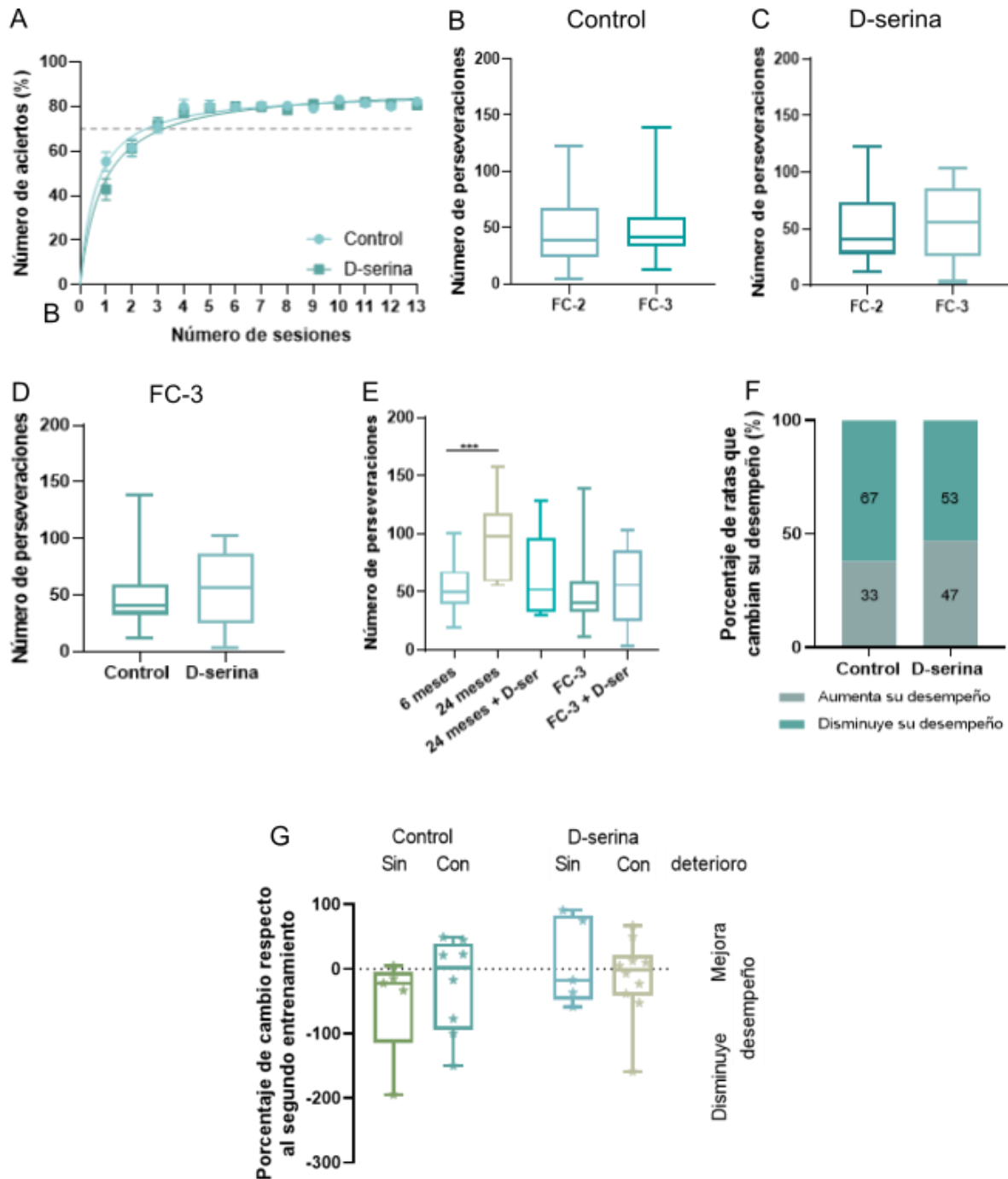


Figura 6. Entrenamientos previos puede preservar la readquisición de un paradigma de condicionamiento operante y la flexibilidad cognitiva en el envejecimiento. A. Curva de adquisición de la tarea a los 24 meses, se representa el promedio del porcentaje de aciertos con error estándar la línea punteada representa el 70% del promedio de aciertos. B. Número de perseveraciones a través de la sesión del control. B. Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones realizadas de las ratas control de la segunda y tercera evaluación de flexibilidad cognitiva ($n=28$ y $n=15$ respectivamente) (U de Mann–Whitney). C. Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones realizadas de las ratas tratadas con D-serina a los 18 meses de la de la segunda y tercera

evaluación de flexibilidad cognitiva (n=34 y n=15 respectivamente) (U de Mann–Whitney). D. Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones realizadas de las ratas control y tratadas durante la tercera evaluación (n=15 y n=15) (U de Mann–Whitney). E. Se presenta las medianas y los rangos intercuartílicos del número de perseveraciones entre ratas de 6 meses (n=28), 24 meses (n=16), 24 meses tratados con D-serina con una sola evaluación de flexibilidad cognitiva (n=14), 24 meses en su tercera evaluación (FC-3) (n=15), 24 meses en su tercera evaluación y que se les administró D-serina a los 18 meses (FC-3 + D-ser) (n=15) F. Comparación del porcentaje de cambio entre la segunda y la tercera evaluación de las ratas control y tratadas con D-serina a los 18 meses. G. Porcentaje de los datos normalizados de los grupos controles y tratados con D-serina subdivididos como sin deterioro (n=5 y n=5 respectivamente) y con deterioro (n=8 y n=10 respectivamente) desempeño en la primera evaluación de flexibilidad cognitiva (Kruskal-Wallis test). FC-2: Segunda evaluación la flexibilidad cognitiva, FC-3: Tercera evaluación la flexibilidad cognitiva.

6.3 Cambios en la conectividad funcional durante el envejecimiento

Para estudiar los cambios en la conectividad funcional seleccionamos estructuras relevantes para la flexibilidad cognitiva: Cíngulo, Corteza retrosplenial (RScx), Corteza frontal de asociación (FrA), Corteza dorsolateral prefrontal (DOL) y el estriado. Utilizando la red obtenida a través del Network-Based Statistic Toolbox (NBS) se establecieron las conexiones con mayor relevancia que fueron: Cíngulo-RScx, Cíngulo-DOL, Cíngulo-FrA, RScx-DOL, DOL-Estriado, Estriado-FrA, FrA-DOL, FrA-RScx (Figura 7). En el laboratorio encontramos que la suplementación de D-serina restaura la conectividad funcional entre la corteza frontal de asociación y la corteza retrosplenial, y el cíngulo y la corteza frontal de asociación (Nava-Gómez, Calero-Vargas et al., 2022).

Primero nos preguntamos qué cambios existían en la conectividad funcional entre las ratas de 12 y 18 meses. En la figura 8 podemos observar que la mayoría de las estructuras a los 18 meses presentan un aumento en la conectividad funcional (Cíngulo-DOL: t test (16) =3.183, p= 0.0062, DOL-Estriado Wilcoxon test Z=109, p= 0.0079, Estriado-FrA: t test (16) =3.055, p= 0.0076, FrA-DOL: t test (16) =3.055, p= 0.0027). Aunque no es estadísticamente significativo también podemos observar cómo existe una tendencia a incrementarse entre el cíngulo y FrA (t test (17) =1.542 p=0.1425). Mientras que la conectividad funcional entre el cíngulo y la RScx disminuye a los 18 meses (t test (17) =5.389 p=<0.0001).

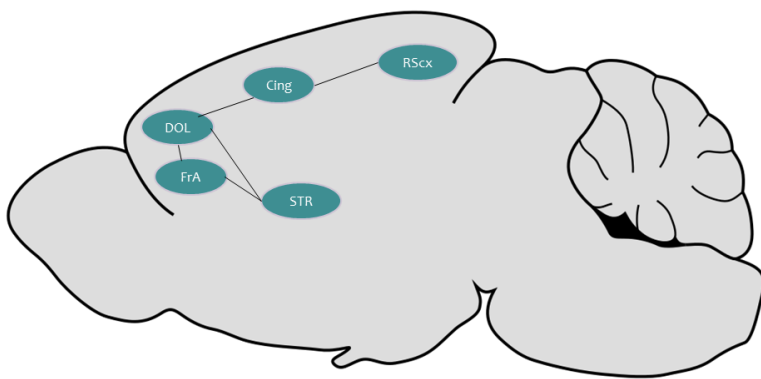


Figura 7. Existen cambios en la red cerebral tras entrenamientos previos. Se identificó una red cerebral afectada por la edad utilizando del Network-Based Statistic Toolbox (NBS), esta red está compuesta por el Cíngulo (Cing), la Corteza retrosplenial (RScx), la Corteza Frontal de asociación (FrA), la Corteza dorsolateral prefrontal (DOL) y el Estriado (STR).

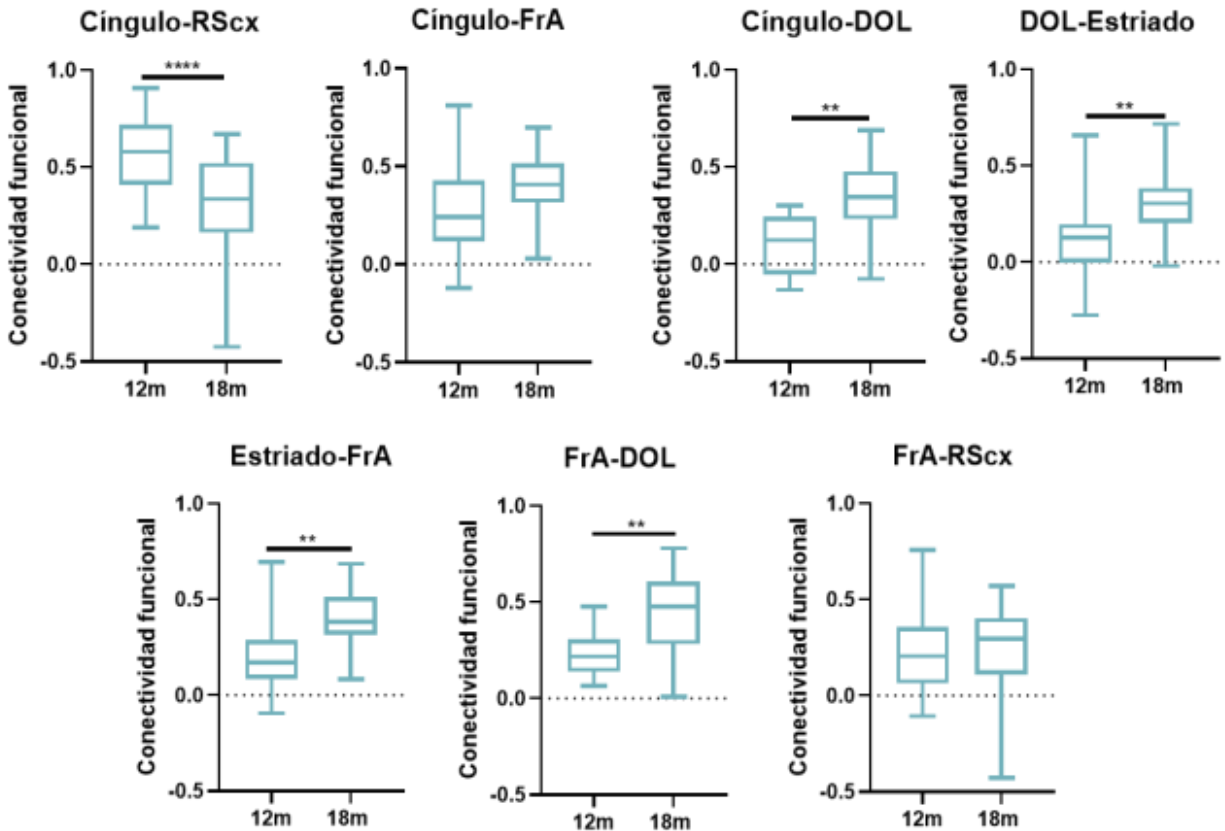


Figura 8. Las ratas control tienden a aumentar su conectividad funcional de los 12 meses a los 18 meses. Se comparó la conectividad funcional entre las ratas control de 12 y 18 meses representados con las medianas y los rangos intercuartílicos. Se observó un aumento entre: Cingulo-DOL $p= 0.0062$, DOL-Estriado $p= 0.0079$, Estriado-FrA $= 0.0076$, FrA-DOL, $p= 0.0076$). No se observaron cambios entre el cíngulo y la RScx ($p=0.1425$) y FrA-RScx ($p=0.2199$). La conectividad funcional entre el cíngulo y la RScx disminuye a los 18 meses ($p:<0.0001$). Corteza frontal de asociación (FrA), Corteza dorsolateral prefrontal (DOL), corteza retrosplenial (RScx). (n=16) * $p<0.05$, ** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

Posteriormente nos preguntamos cómo cambiaba la conectividad funcional en las ratas a las que se les suplementó D-serina (Figura 9). A diferencia de las ratas control, este grupo en la solo mostró una disminución en la conectividad funcional entre el cíngulo y la RScx (t test (21) =2.848 $p= 0.0096$) y un aumento entre la FrA y la DOL (Wilcoxon test $Z=145$, $p= 0.0172$) sin cambios en la conectividad funcional entre las otras estructuras (Cíngulo y la FrA (t test (21) =0.5750, $p= 0.5714$), el Cíngulo y la DOL (t test (21) =0.5750,

p= 0.3953), la DOL y el Estriado (Wilcoxon test Z=39, p= 0.5446), Estriado y FrA (t test (21) =0.3206, p= 0.7517 y FrA y RScx FrA (t test (21) =0.1554, p= 0.8780)).

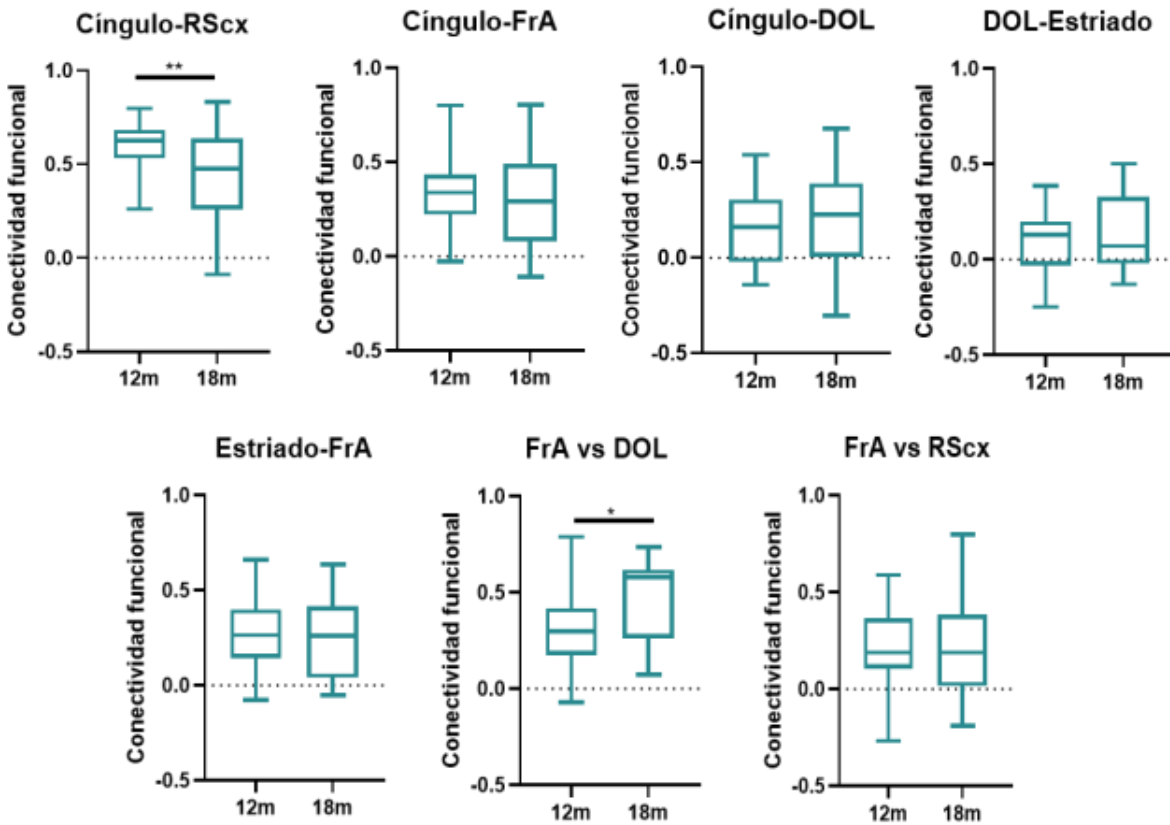


Figura 9. Las ratas suplementadas con D-serina no muestran un aumento en su **conectividad funcional de los 12 a los 18 meses**. Se comparó la conectividad funcional representada con las medianas y los rangos intercuartílicos entre las ratas suplementadas de 12 y 18 meses no observamos cambios entre la mayoría de las estructuras. Cingulo-FrA (p= 0.5714), Cingulo- DOL (p= 0.3953), DOL-Estriado (p= 0.5446), Estriado-FrA (p= 0.7517) y FrA -RScx (p= 0.8780). Existió una disminución entre el Cingulo-RScx (p=0.096) y un aumento entre la FrA-DOL (p= 0.0172). Corteza frontal de asociación (FrA), Corteza dorsolateral prefrontal (DOL), corteza retrosplenial (RScx). (n=22) * p<0-05, **p<0.001, ****p<0.0001.

Los cambios en la conectividad cerebral funcional entre el grupo control y suplementado con D-serina entre los 12 y los 18 meses de muestran en la figura 10. Como se puede observar existen diferencias significativas entre el grupo control y D-serina entre el Cingulo y la FrA (U de Mann–Whitney=102, p=0.0244), DOL y el estriado (U de Mann–

Whitney=99, $p=0.0346$) y la FrA y el estriado (U de Mann–Whitney=107, $p=0.0231$). Estos resultados significan que, aunque el desempeño en la flexibilidad cognitiva en ratas control y suplementados con D-serina son comparables, estos grupos utilizan diferentes redes cerebrales para cumplir con esta función cognitiva.

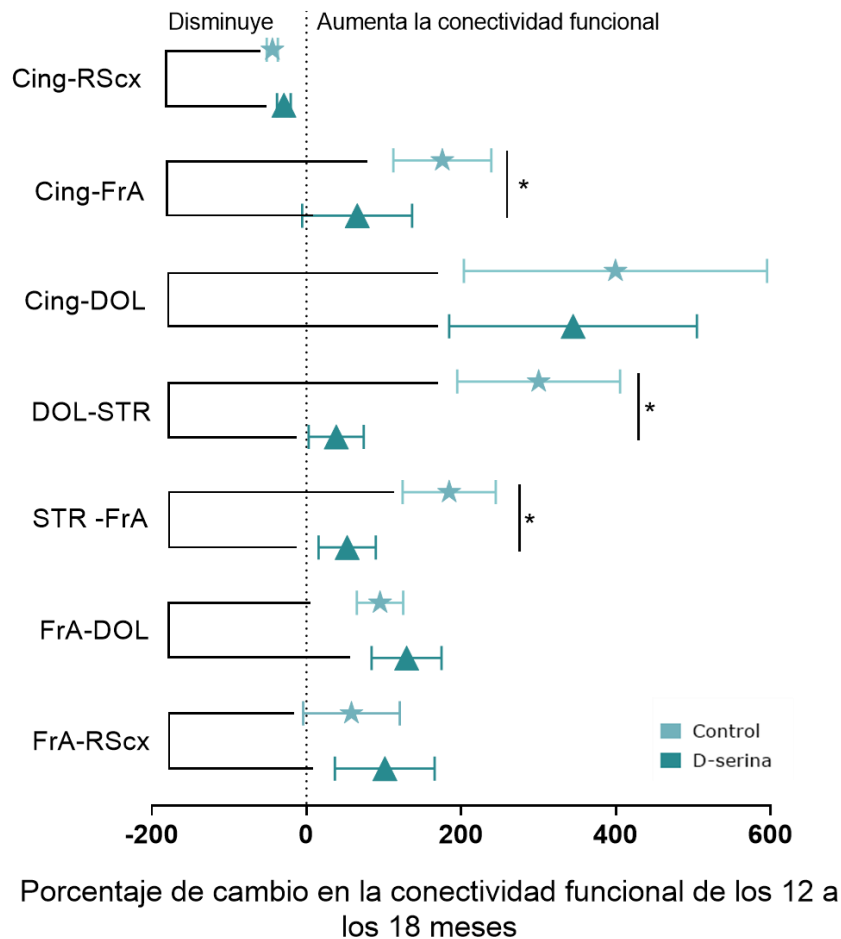


Figura 10. Las ratas control presentan un mayor aumento en la conectividad funcional a los 18 meses que las ratas suplementadas con D-serina. Se compararon el promedio de los porcentajes de cambio con error estándar entre el grupo control y suplementado, la línea punteada indica el 0% es decir cuando no hay cambios. Los datos a la derecha son los que aumentan y los de la izquierda los que disminuyen. El grupo control presenta un mayor porcentaje de cambio entre el Cíngulo y la FrA. ($p=0.0244$), la DOL y el estriado ($p=0.0346$) y el estriado y la FrA ($p=0.0231$). Corteza frontal de asociación (FrA), Corteza dorsolateral prefrontal (DOL), corteza retrosplenial (RScx), Estriado (STR) y Cíngulo (Cing) (* $p<0.05$, ** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

Posteriormente nos preguntamos si persistían los cambios en la conectividad funcional a los 24 meses. En la figura 11 podemos observar que en el grupo control disminuye la conectividad funcional entre Cíngulo-FrA ($t(27) = 3.070$, $p = 0.048$), DOL-Estriado ($t(27) = 2.478$, $p = 0.0198$), Estriado-FrA ($t(27) = 2.290$, $p = 0.0301$) y FrA-RScx ($t(26) = 2.658$, $p = 0.0133$). De manera interesante varias de las estructuras que podemos observar disminuyeron su conectividad funcional, de hecho, presentaron un aumento a los 18 meses (DOL-Estriado y Estriado-FrA).

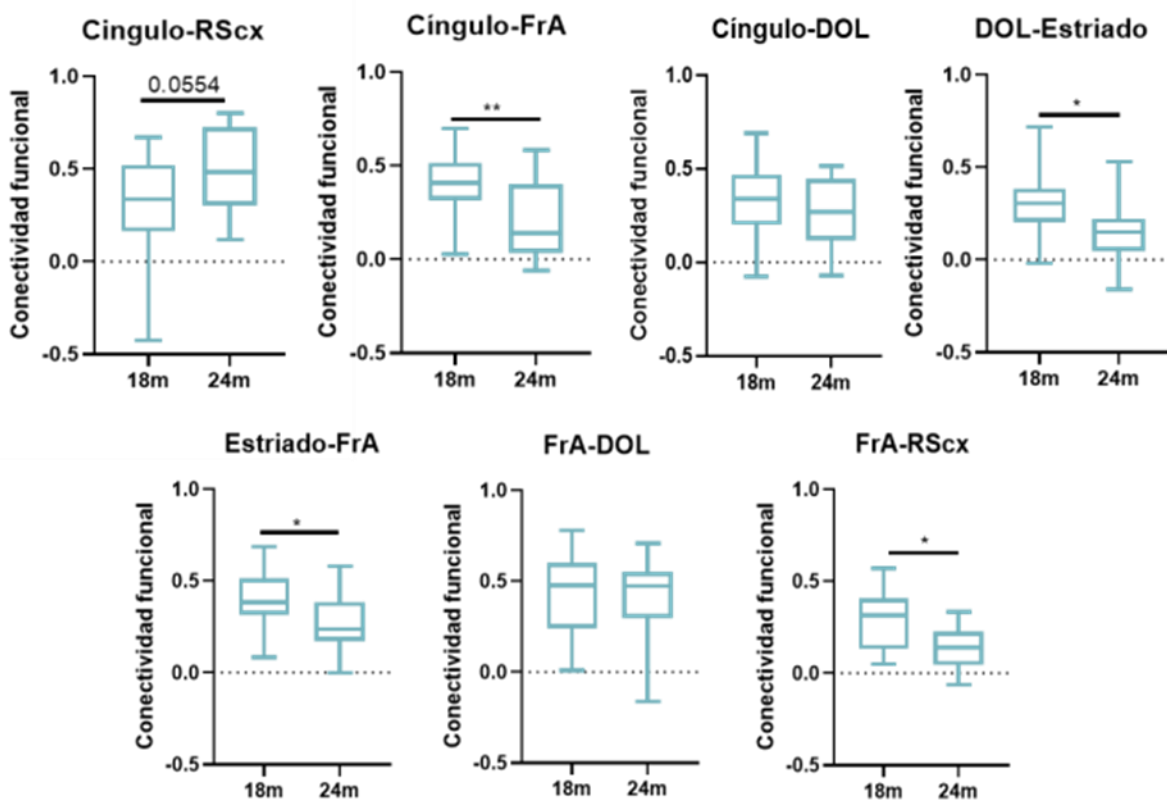


Figura 11. Las ratas control disminuyen su conectividad funcional a los 24 meses. Se comparó la conectividad funcional representada con las medianas y los rangos entre las ratas control de 18 y 24 meses. Se observó una disminución entre: Cíngulo-FrA ($p = 0.0062$), DOL-Estriado ($p = 0.0198$), Estriado-FrA ($p = 0.0307$) y FrA-RScx ($p = 0.0133$). No se observaron cambios estadísticamente significativos entre el Cíngulo-RScx ($p = 0.0554$), Cíngulo-DOL ($p = 0.6365$) y FrA-DOL ($p = 0.9661$) Corteza dorsolateral prefrontal (DOL), corteza retrosplenial (RScx). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Luego nos preguntamos si existía también una disminución en la conectividad funcional entre las estructuras en las ratas que fueron suplementadas con D-serina a los 18 meses (Figura 12). A diferencia del grupo control las ratas tratadas con D-serina solo muestran una disminución en la conectividad funcional entre cíngulo-FrA (t test (33) =2.094, $p=0.0440$) y la FrA-RScx (U de Mann–Whitney = 87, $p=0.0075$).

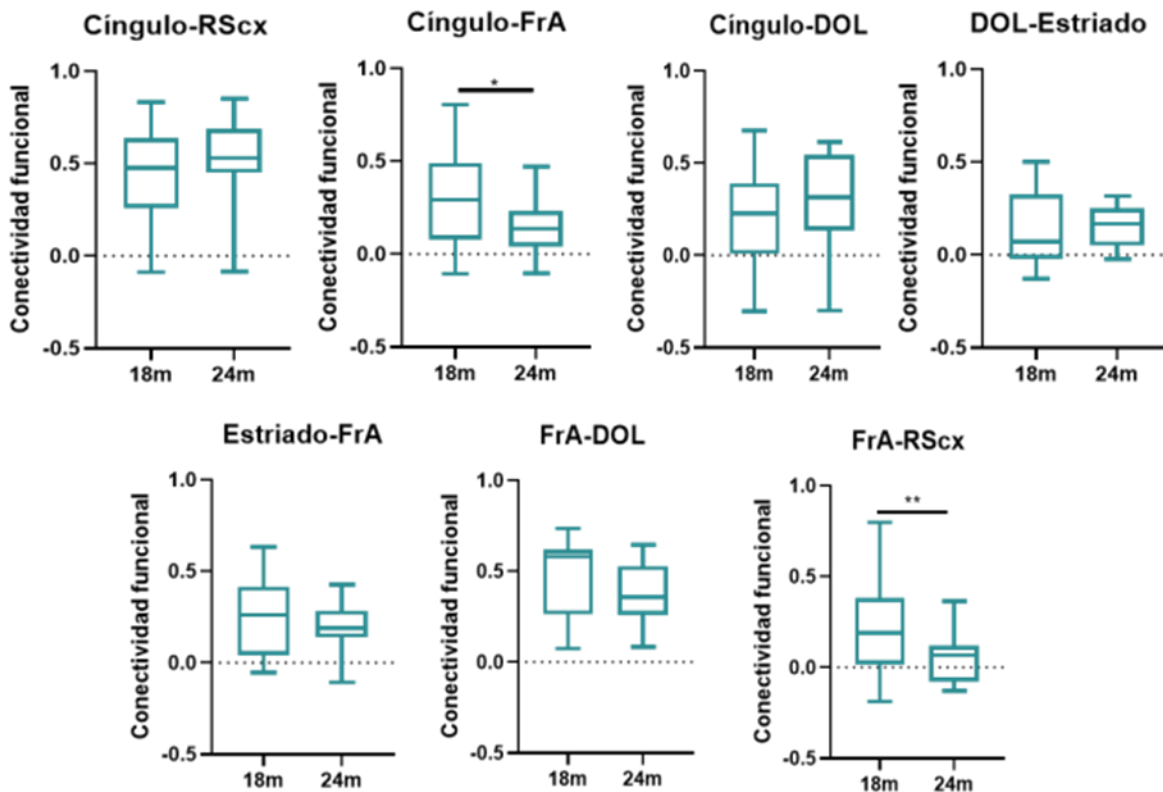


Figura 12. Las ratas suplementadas con D-serina no muestran cambios entre la mayoría de las estructuras de los 18 a los 24 meses. Se comparó la conectividad funcional representada con las medianas y los rangos intercuartílicos entre las ratas suplementadas de 18 y 24 meses no observamos cambios entre la mayoría de las estructuras. Cíngulo-FrA ($p=0.5714$), Cíngulo-DOL ($p=0.3953$), DOL-Estriado ($p=0.5446$), Estriado-FrA ($p=0.7517$) y FrA-RScx (t test (21) =0.1554, $p=0.8780$). Existió una disminución entre el cíngulo-RScx ($p=0.096$) y un aumento entre la FrA-DOL ($p=0.0172$). Corteza frontal de asociación (FrA), Corteza dorsolateral prefrontal (DOL), corteza retrosplenial (RScx). (n=22) * $p<0.05$, ** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

Al igual que con las ratas de 12 y 18 meses, comparamos los cambios en la conectividad cerebral funcional entre el grupo control y suplementado con D-serina en la figura 13. Como se puede observar entre la mayoría de las estructuras no existe una diferencia significativa entre los porcentajes de cambio. Solamente se puede ver un aumento en la

conectividad funcional del grupo que fue tratado con D-serina entre la DOL y el estriado (U de Mann–Whitney = 87, $p= 0.0410$).

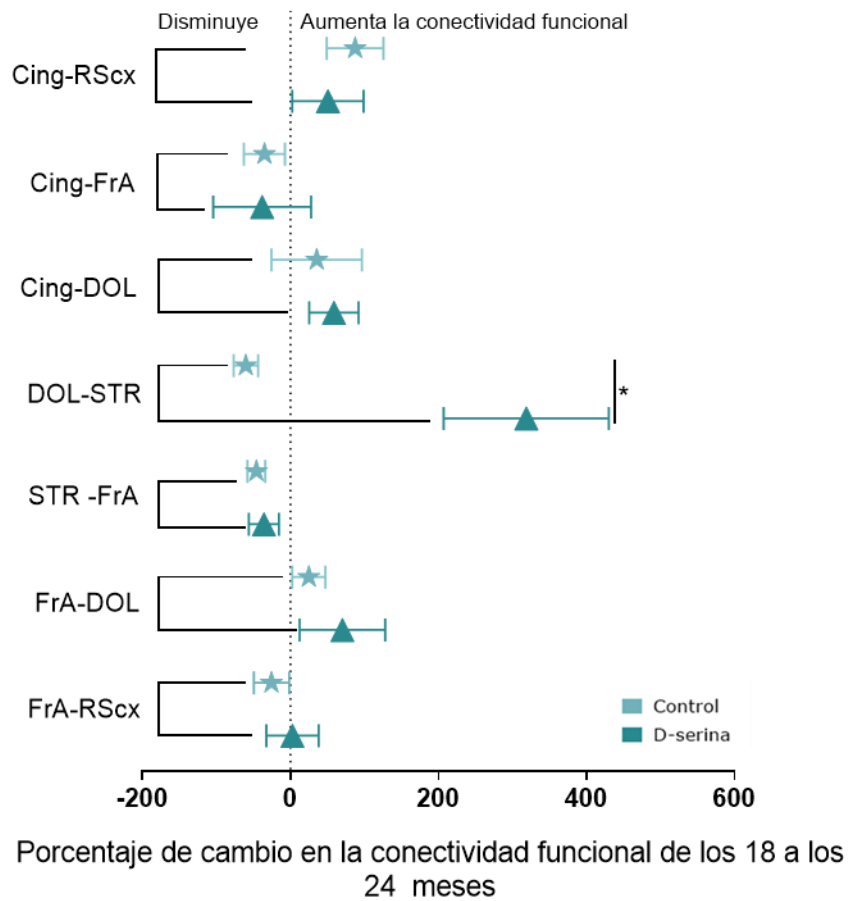


Figura 13. Las ratas control y suplementadas con D-serina no presentan diferencias en los porcentajes de cambio. Se compararon los promedios con error estandar de porcentajes de cambio entre el grupo control y suplementado, la línea punteada indica el 0% es decir cuando no hay cambios. Los datos a la derecha son los que aumentan y los de la izquierda los que disminuyen. El grupo tratado con D-serina presenta un aumento en la conectividad entre la DOL y el estriado ($p=0.0410$). Corteza frontal de asociación (FrA), Corteza dorsolateral prefrontal (DOL), corteza retrosplenial (RScx), Estriado (STR) y Cíngulo (Cing) (* $p<0-05$, ** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

7. Discusión

Muchos de los trabajos que estudian el detrimento de las funciones cognitivas se basan en análisis transversales en una edad en particular, lo que limita la comprensión de los ajustes dinámicos en las trayectorias de envejecimientos. Por otro lado, los estudios longitudinales permiten analizar los efectos de las intervenciones realizadas en los animales en un momento particular del envejecimiento de forma que se pueden analizar los efectos a largo plazo.

7.1 Adquisición de la tarea

Para poder llevar a cabo la evaluación de la flexibilidad cognitiva primero se entrenó a los animales en una tarea de aprendizaje inverso utilizando un paradigma de condicionamiento operante, en donde el aprendizaje se produce mediante recompensas por una respuesta voluntaria (por ejemplo, presionar una palanca). A través de este condicionamiento, se establece una asociación entre un comportamiento y la consecuencia de éste. La mayoría de las ocasiones se requieren varias sesiones de entrenamiento para que los animales asocien la respuesta con el reforzador (Carter et al., 2015; Goddard, 2012). En el paradigma utilizado, las ratas de 12 meses aprendieron a presionar la palanca ipsilateral a la luz para obtener una recompensa y necesitaron 20 sesiones para adquirir la tarea con un desempeño de más del 70%. En el laboratorio hemos caracterizado estas tareas en estudios transversales a distintas edades (6,12,18 y 24 meses) y observamos que, independientemente de la edad no hay diferencias en las curvas de adquisición (Nava-Gómez, Calero-Vargas et al., 2022). Estos resultados entre animales jóvenes y envejecidos coinciden con lo reportado en paradigmas similares de condicionamiento operante (Nomura et al., 2004; Samson et al., 2014). Sin embargo, estas curvas si se modificaron cuando las ratas ya habían estado expuestas a la tarea (ratas de 18 y 24 meses de edad) mostrándose una disminución en el número de sesiones necesarias para alcanzar el 70 % de aciertos (4 sesiones en lugar de 9 del primer entrenamiento). Esto sugiere que las ratas mantuvieron información de la tarea en los subsecuentes entrenamientos como un proceso de memoria de procedimiento. En

este sentido, se ha observado que la memoria de procedimiento adquirida en la juventud puede beneficiar el desempeño en el envejecimiento (van Groen et al., 2002).

Estas curvas no se vieron modificadas en las ratas que recibieron la suplementación crónica con D-serina lo que sugiere que la D-serina no mejoró la evocación de la memoria de procedimiento. Esto coincide con resultados previos del laboratorio, de estudios transversales, en donde el tratamiento con D-serina no influye en la adquisición y readquisición de la tarea (Nava-Gómez, Calero-Vargas et al., 2022). De manera similar, esto corresponde con lo reportado por Otte y colaboradores en un paradigma de condicionamiento operante en donde también mostraron que la suplementación oral de D-serina no modificaba el comportamiento en una tarea de condicionamiento operante (Otte et al., 2013). Estos hallazgos también coinciden con reportes en la literatura en la evaluación del aprendizaje reverso, en donde la administración de distintos antagonistas del receptor NMDA no afecta la adquisición de la tarea inicial (Abdul-Monim et al., 2003; Dalton et al., 2011; Idris et al., 2005; McLean et al., 2010).

7.2 Efecto de la reserva cognitiva sobre la flexibilidad cognitiva

Las ratas de 12 meses (de mediana edad), presentan un declive en el desempeño de la flexibilidad cognitiva al compararlas con ratas jóvenes (6 meses). En diversos estudios en los que se evalúan funciones cognitivas como la memoria de trabajo, la memoria espacial y la flexibilidad cognitiva se ha observado que animales de mediana edad presentan un deterioro en el desempeño. Esta disminución en el desempeño de los animales se ha adjudicado a distintos cambios estructurales, funcionales y de la conectividad funcional (Chang et al., 2022; Dellu-Hagedorn et al., 2004; Febo et al., 2020; Frick et al., 2003; Laclair et al., 2019; Shoji et al., 2016).

En el presente trabajo, que es un estudio longitudinal podemos observar que a los 18 meses la mayoría de las ratas presentan una mejoría en el desempeño en la flexibilidad cognitiva siendo similar al de ratas jóvenes (6 meses) (Figura 6 B yD). Se ha estudiado el efecto que tienen experiencias previas en la estructura y función cerebral

observándose que estímulos enriquecedores como el ejercicio, el ambiente enriquecido y entrenamientos previos (Brockett et al., 2015; Rosenzweig & Bennett, 1996), producen un incremento en los recursos neurales como una mayor neurogénesis, sinaptogénesis, gliogénesis y una facilitación en la inducción de la LTP y la LTD, y por lo tanto un incremento en la reserva cognitiva (Dellu et al., 1997; Freret et al., 2012; Garthe et al., 2016; Gelfo et al., 2011; Kolb et al., 2003; Kumar et al., 2012; Sampedro-Piquero et al., 2014; Rosenzweig & Bennett, 1996).

Esta reserva tiene efectos positivos sobre la flexibilidad cognitiva en animales jóvenes-adultos de tres meses de edad (Brockett et al., 2015; Rountree-Harrison et al., 2018; Sampedro-Piquero et al., 2015; Schrijver et al., 2004; Zeleznikow-Johnston et al., 2017). Estos cambios conductuales se han asociado con un aumento en la densidad y la longitud de las espinas dendríticas, la expresión de marcadores sinápticos y gliales en la corteza prefrontal y el hipocampo así como una mayor activación del cíngulo y la corteza prefrontal, medido a través de la expresión de c-Fos (Brockett et al., 2015; Sampedro-Piquero et al., 2015). Nuestros resultados muestran una mejora en el desempeño de los animales en una evaluación de la flexibilidad cognitiva que pudiera entonces ser atribuido a un aumento en la reserva cognitiva y que prevalece en etapas tardías de la adultez (18 meses) y en el envejecimiento (24 meses).

Como se comentó previamente experiencias previas inducen diversos cambios a nivel celular y molecular, que se puede entender como los recursos neurales que se van acumulando para favorecer el incremento de la reserva cognitiva. Otro ejemplo de un recurso neural puede ser la conectividad funcional entre estructuras cerebrales (Cabeza et al., 2018). En nuestro laboratorio hemos reportado que ratas envejecidas, sin un incremento de la reserva cognitiva, presentan un declive en la flexibilidad cognitiva y una menor conectividad funcional cerebral en comparación con ratas jóvenes (Nava-Gómez, Calero-Vargas et al., 2022). En otras tareas conductuales se ha asociado una menor conectividad funcional con un pobre desempeño en la tarea en animales envejecidos (Ash et al., 2016; Febo et al., 2020). Con esto en mente quisimos evaluar en los grupos experimentales cómo cambiaba la conectividad funcional entre diversas estructuras

cerebrales relevantes para la flexibilidad cognitiva como lo son el cíngulo, la corteza retrosplenial (RScx), la corteza frontal de asociación (FrA), la corteza dorsolateral prefrontal (DOL) y el estriado (Dajani & Uddin, 2015; Izquierdo et al., 2017). Nuestros resultados muestran que el entrenamiento previo incrementa la conectividad funcional entre Cíngulo-DOL, DOL-Estriado, Estriado-FrA, FrA-DOL. En estudios con humanos se ha observado que una mayor actividad de estructuras frontales se asocia con un mejor desempeño en adultos mayores en tareas relacionadas con la memoria de trabajo y el procesamiento verbal (Grady et al., 2012). Como se mencionó anteriormente se ha observado que un mejor desempeño en pruebas de flexibilidad cognitiva se relaciona con una mayor activación entre el cíngulo y estructuras prefrontales medido a través de la expresión de c-Fos (Brockett et al., 2015). En este trabajo podemos observar también como hay un incremento la conectividad funcional entre Cíngulo y una la corteza dorsolateral prefrontal evaluada con fMRI.

7. 3 Efecto de la D-serina en la reserva cognitiva sobre la flexibilidad cognitiva

Una de las causas a las que se le ha atribuido el declive cognitivo durante el envejecimiento es la hipofunción de los receptores NMDA. Esta hipofunción se puede deber a una disminución en la expresión de las subunidades que lo conforman (Magnusson, 2012). Otra posible explicación puede ser la disminución de la concentración de su co-agonista D-serina. Se ha observado que en roedores envejecidos existe una disminución en la expresión de la SR, que conduce a disminución en la concentración de la D-serina (Billard, 2013; Junjaud et al., 2006). En rebanas de animales envejecidos ha sido posible rescatar la transmisión sináptica mediada por receptores NMDA al administrar D-serina exógena. La administración de D-cicloserina, un co-agonista parcial del receptor NMDA, también es capaz de mejorar la flexibilidad cognitiva y la memoria social en ratas envejecidas (Portero-Tresserra et al., 2018). Nosotros en el laboratorio, encontramos que la suplementación de D-Serina es capaz de rescatar el desempeño de animales en una evaluación de flexibilidad cognitiva y la conectividad funcional en ratas viejas, sin previas experiencias (Nava-Gómez, Calero- Vargas et al.,

2022).

De manera general, tanto los animales control como los suplementados con D-serina presentan un efecto positivo en el desempeño de la flexibilidad cognitiva a los 18 meses (Figura 5B, D y E). Pero al analizar los datos de manera individual, observamos en el grupo de ratas suplementadas con D-serina, que un mayor porcentaje de ratas presentan una disminución en el desempeño de la flexibilidad cognitiva durante la segunda evaluación. Para poder entender mejor este efecto dividimos a las ratas en dos grupos: aquellos con y sin deterioro basándonos en su desempeño a los 12 meses. Es posible observar diferencias en grupos en diversas pruebas conductuales siendo posible segregarnos en aquellos que ya presentan deficiencias relacionados con la edad y los que mantienen sus funciones cognitivas intactas, manteniendo características en su fisiología similares a los de sus contrapartes jóvenes (Hullinger & Burger, 2015; Matzel et al., 2011; Mota et al., 2019; Schoenbaum et al., 2006; Woodruff-Pak et al., 2010).

En la Figura 6C mostramos que las ratas a los 12 meses no mostraban un deterioro cognitivo y al suplementarles D-serina empeoraron en la prueba de flexibilidad cognitiva a los 18 meses. Esto se puede entender con base en el funcionamiento de los receptores NMDA, los cuales por un lado participan en la plasticidad sináptica para la ejecución de diversas funciones cognitivas y por otro pueden causar neurotoxicidad e iniciar distintos tipos de muerte neuronal (Zorumski & Izumi, 2012). La producción de D-serina es regulada de manera cuidadosa manteniendo la concentración en rangos fisiológicos (Coyle et al., 2020) Por lo que incrementos en la concentración de D-serina se han asociado con neurotoxicidad mediada por los receptores NMDA (Beltrán-Castillo et al., 2018).

De manera natural se ha observado que la exposición a ambientes enriquecidos permite un incremento de la liberación de D-serina por los astrocitos; esta se ve disminuida durante el envejecimiento (Lalo et al., 2018). Una posible explicación relacionada con esta disminución en el desempeño es que las ratas a los 12 meses aun preserven sus concentraciones de D-serina intactas, lo cual sumado al incremento por el aprendizaje

previo y la suplementación de D-serina, promueve la neurotoxicidad mediada por los receptores NMDA.

Otro aspecto en lo que los receptores NMDA se ven involucrados es la meta-plasticidad, en donde la activación de estos receptores puede regular el umbral para la inducción de LTP y LTD (Zorumski & Izumi, 2012). En este sentido, Lalo y colaboradores en el 2018 demostraron que la D-serina y el ATP liberados por astrocitos, pueden estar implicados en modificaciones bidireccionales de la fuerza sináptica y por ende en la meta-plasticidad (Lalo et al., 2018). Es posible que en los animales que aún no presentaba deterioro cognitivo a los 12 meses presentaban una actividad eficiente por lo que la administración exógena de D-serina produjo cambios en el umbral necesario para la inducción LTP promoviendo además estados de depresión de la fuerza sináptica.

Posteriormente quisimos ver cómo cambiaba la conectividad funcional con la suplementación de D-serina. Interesantemente el grupo que fue suplementado con D-serina no presentó un aumento en la conectividad a los 18 meses como el grupo control. La D-serina es capaz de modular la conectividad funcional en restaurándola en animales envejecidos, pero también es capaz de restaurar de la complejidad de los árboles dendríticos (Nava-Gómez, Calero- Vargas et al., 2022). Alguno de los factores que pueden influenciar la señal BOLD se relacionan con características como la complejidad y densidad de las espinas dendríticas (Marcar et al., 2004; Smith et al., 2002). Se ha encontrado que la inducción de la LTD es capaz de disminuir la densidad de las espinas dendríticas (Zhou et al., 2004). A su vez se ha observado que la D-serina es capaz de inducir LTD, por lo que p (Duffy et al., 2007; Zhang et al., 2008).

Es posible que la suplementación module la manera en que las estructuras se comunican y exista algún otro tipo de mecanismos para responder a las demandas cognitivas, ocurriendo algún tipo de reorganización en el circuito y otras estructuras sean utilizadas. Puede que exista algún tipo de compensación por reorganización donde se usen mecanismos que normalmente no estén disponibles. Un ejemplo que apoya esta noción es que se ha observado que en, adultos mayores durante una prueba de memoria,

presentaban actividad frontal bilateral, mientras que los jóvenes presentaban actividad unilateral (Cabeza et al., 2018).

8 conclusiones

1. El grupo control y el tratado con D-serina, que tuvieron un entrenamiento previo por lo que contaban con una mayor reserva cognitiva, presentaron una restauración y prevención de la flexibilidad cognitiva de igual magnitud.
2. La suplementación crónica con D-serina puede producir un detrimento de flexibilidad cognitiva en ratas con un buen desempeño a mediana edad, que se ve reflejada como un incremento en el número de perseveraciones.
3. Aunque de manera general el grupo control y el tratado con D-serina presenta el mismo efecto conductual, presentan diferencias a nivel de la conectividad funcional; donde solamente el grupo control presenta un incremento entre estructuras relevantes para la flexibilidad cognitiva.

9. Referencias

Abdul-Monim, Z., Reynolds, G. P., & Neill, J. C. (2003). The atypical antipsychotic ziprasidone, but not haloperidol, improves phencyclidine-induced cognitive deficits in a reversal learning task in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, 17(1), 57–65. <https://doi.org/10.1177/0269881103017001700>

Amitai, N., & Markou, A. (2010). Disruption of performance in the five-choice serial reaction time task induced by administration of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: relevance to cognitive dysfunction in schizophrenia. *Biological psychiatry*, 68(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.03.004>

Anthony, M., & Lin, F. (2018). A Systematic Review for Functional Neuroimaging Studies of Cognitive Reserve Across the Cognitive Aging Spectrum. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 33(8), 937–948. <https://doi.org/10.1093/ARCLIN/ACX125>

Ash, J. A., Lu, H., Taxier, L. R., Long, J. M., Yang, Y., Stein, E. A., & Rapp, P. R. (2016a). Functional connectivity with the retrosplenial cortex predicts cognitive aging in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), 12286–12291. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1525309113/-/DCSUPPLEMENTAL>

Ash, J. A., Lu, H., Taxier, L. R., Long, J. M., Yang, Y., Stein, E. A., & Rapp, P. R. (2016b). Functional connectivity with the retrosplenial cortex predicts cognitive aging in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), 12286–12291. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1525309113/-/DCSUPPLEMENTAL>.

Bado, P., Madeira, C., Vargas-Lopes, C., Moulin, T. C., Wasilewska-Sampaio, A. P., Maretti, L., de Oliveira, R. V., Amaral, O. B., & Panizzutti, R. (2011). Effects of low- dose D-serine on recognition and working memory in mice. *Psychopharmacology*, 218(3), 461–

470. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2330-4>

Balu, D. T., & Coyle, J. T. (2015). The NMDA receptor 'glycine modulatory site' in schizophrenia: D-serine, glycine, and beyond. *Current opinion in pharmacology*, 20, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.12.004>

Bardaweel, S. K., Alzweiri, M., & Ishaqat, A. A. (2014). D-Serine in neurobiology: CNS neurotransmission and neuromodulation. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 41(2), 164–176. <https://doi.org/10.1017/s031716710001653x>

Baviera, M., Invernizzi, R. W., & Carli, M. (2008). Haloperidol and clozapine have dissociable effects in a model of attentional performance deficits induced by blockade of NMDA receptors in the mPFC. *Psychopharmacology*, 196(2), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0959-9>

Beltrán-Castillo, S., Eugénín, J., & von Bernhardt, R. (2018). Impact of Aging in Microglia-Mediated D-Serine Balance in the CNS. *Mediators of inflammation*, 2018, 7219732. <https://doi.org/10.1155/2018/7219732>

Billard, J. M. (2013). Serine racemase as a prime target for age-related memory deficits. *European Journal of Neuroscience*, 37(12), 1931–1938. <https://doi.org/10.1111/EJN.12226>

Bizon, J. L., Foster, T. C., Alexander, G. E., & Glisky, E. L. (2012). Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00019>

Bloss, E. B., Janssen, W. G., Ohm, D. T., Yuk, F. J., Wadsworth, S., Saardi, K. M., McEwen, B. S. & Morrison, J. H. (2011). Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 31(21),

7831-7839. 10.1523/JNEUROSCI.0839-11.2011

Brady, A. M., & Floresco, S. B. (2015). Operant procedures for assessing behavioral flexibility in rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (96), e52387. <https://doi.org/10.3791/52387>

Brockett, A. T., LaMarca, E. A., & Gould, E. (2015). Physical Exercise Enhances Cognitive Flexibility as Well as Astrocytic and Synaptic Markers in the Medial Prefrontal Cortex. *PLOS ONE*, 10(5), e0124859. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0124859>

Burstein, S. M., & Finch, C. E. (2018). Longevity examined: an ancient Greek's very modern views on ageing. *Nature*, 560(7719), 430. <https://doi.org/10.1038/D41586-018-05986-1>

Cabeza, R., Albert, M., Belleville, S., Craik, F. I. M., Duarte, A., Grady, C. L., Lindenberger, U., Nyberg, L., Park, D. C., Reuter-Lorenz, P. A., Rugg, M. D., Steffener, J., & Rajah, M. N. (2018). Maintenance, reserve and compensation: the cognitive neuroscience of healthy ageing. *Nature Reviews Neuroscience* 2018 19:11, 19(11), 701–710. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0068-2>

Carli, M., & Invernizzi, R. W. (2014). Serotonergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuit in executive and attention deficits induced by NMDA receptor hypofunction in the 5-choice serial reaction time task. *Frontiers in neural circuits*, 8, 58. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00058>

Clarke, H. F., Robbins, T. W., & Roberts, A. C. (2008). Lesions of the medial striatum in monkeys produce perseverative impairments during reversal learning similar to those produced by lesions of the orbitofrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(43), 10972–10982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1521-08.2008>

Chang, W., Weaver, C. M., Medalla, M., Moore, T. L., & Luebke, J. I. (2022). Age-related

alterations to working memory and to pyramidal neurons in the prefrontal cortex of rhesus monkeys begin in early middle-age and are partially ameliorated by dietary curcumin. *Neurobiology of Aging*, 109, 113–124. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2021.09.012>

Chen, J. J. (2019). Functional MRI of brain physiology in aging and neurodegenerative diseases. *NeuroImage*, 187, 209–225. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2018.05.050>

Chudasama, Y., Passetti, F., Rhodes, S. E., Lopian, D., Desai, A., & Robbins, T. W. (2003). Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behavioural brain research*, 146(1-2), 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.020>

Crofts, A., Trotman-Lucas, M., Janus, J., Kelly, M., & Gibson, C. L. (2020). A longitudinal, multi-parametric functional MRI study to determine age-related changes in the rodent brain. *Neuroimage*, 218. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2020.116976>

Dajani, D. R., & Uddin, L. Q. (2015). Demystifying cognitive flexibility: Implications for clinical and developmental neuroscience. *Trends in Neurosciences*, 38(9), 571–578. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2015.07.003>

Dalton, G. L., Ma, L. M., Phillips, A. G., & Floresco, S. B. (2011). Blockade of NMDA GluN2B receptors selectively impairs behavioral flexibility but not initial discrimination learning. *Psychopharmacology*, 216(4), 525–535. <https://doi.org/10.1007/S00213-011-2246-Z/FIGURES/2>

Dalton, G. L., Wang, N. Y., Phillips, A. G., & Floresco, S. B. (2016). Multifaceted Contributions by Different Regions of the Orbitofrontal and Medial Prefrontal Cortex to

Probabilistic Reversal Learning. *The Journal of Neuroscience*, 36(6), 1996.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3366-15.2016>

Daselaar, S. M., Iyengar, V., Davis, S. W., Eklund, K., Hayes, S. M., & Cabeza, R. E. (2015). Less Wiring, More Firing: Low-Performing Older Adults Compensate for Impaired White Matter with Greater Neural Activity. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, 25(4), 983.
<https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHT289>

Darvas, M., & Palmiter, R. D. (2015). Specific contributions of N-methyl-D-aspartate receptors in the dorsal striatum to cognitive flexibility. *Neuroscience*, 284, 934–942.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.011>

Dellu, F., Mayo, W., Vallee, M., le Moal, M., & Simon, H. (1997). Facilitation of cognitive performance in aged rats by past experience depends on the type of information processing involved: A combined cross-sectional and longitudinal study. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 121–128. <https://doi.org/10.1006/NLME.1996.3750>

Dellu-Hagedorn, F., Trunet, S., & Simon, H. (2004). Impulsivity in youth predicts early age-related cognitive deficits in rats. *Neurobiology of Aging*, 25(4), 525–537.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2003.06.006>

Dieguez, D., Jr, & Barea-Rodriguez, E. J. (2004). Aging impairs the late phase of long-term potentiation at the medial perforant path-CA3 synapse in awake rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 52(1), 53–61. <https://doi.org/10.1002/syn.20004>

Donegan, J. J., Girotti, M., Weinberg, M. S., & Morilak, D. A. (2014). A novel role for brain interleukin-6: facilitation of cognitive flexibility in rat orbitofrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(3), 953–962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3968-13.2014>

Duffy, S., Labrie, V., & Roder, J. C. (2007). D-Serine Augments NMDA-NR2B Receptor-

Dependent Hippocampal Long-Term Depression and Spatial Reversal Learning. *Neuropsychopharmacology* 2008 33:5, 33(5), 1004–1018. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301486>

Dumitriu, D., Hao, J., Hara, Y., Kaufmann, J., Janssen, W. G., Lou, W., Rapp, P. R. & Morrison, J. H. (2010). Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7507–7515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6410-09.2010>

Febo, M., Rani, A., Yegla, B., Barter, J., Kumar, A., Wolff, C. A., Esser, K., & Foster, T. C. (2020). Longitudinal Characterization and Biomarkers of Age and Sex Differences in the Decline of Spatial Memory. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 34. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2020.00034/BIBTEX>

Floresco, S. B., Zhang, Y., & Enomoto, T. (2009). Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 204(2), 396–409. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2008.12.001>

Freret, T., Billard, J. M., Schumann-Bard, P., Dutar, P., Dauphin, F., Boulouard, M., & Bouet, V. (2012). Rescue of cognitive aging by long-lasting environmental enrichment exposure initiated before median lifespan. *Neurobiology of Aging*, 33(5), 1005.e1–1005.e10. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2011.09.028>

Frick, K. M., Stearns, N. A., Pan, J. Y., & Berger-Sweeney, J. (2003). Effects of Environmental Enrichment on Spatial Memory and Neurochemistry in Middle-Aged Mice. *Learning & Memory*, 10(3), 187–198. <https://doi.org/10.1101/LM.50703>

Garthe, A., Roeder, I., & Kempermann, G. (2016). Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 26(2), 261–271.

<https://doi.org/10.1002/HIPO.22520>

Gelfo, F., Cutuli, D., Foti, F., Laricchiuta, D., De-Bartolo, P., Caltagirone, C., Petrosini, L., & Angelucci, F. (2011). Enriched environment improves motor function and increases neurotrophins in hemicerebellar lesioned rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 25(3), 243–252. <https://doi.org/10.1177/1545968310380926>

Gorbach, T., Pudas, S., Lundquist, A., Orädd, G., Josefsson, M., Salami, A., de Luna, X., & Nyberg, L. (2017). Longitudinal association between hippocampus atrophy and episodic-memory decline. *Neurobiology of Aging*, 51, 167–176. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2016.12.002>

Grady, C. (2012). Trends in Neurocognitive Aging. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(7), 491. <https://doi.org/10.1038/NRN3256>

Hamilton, D. A., & Brigman, J. L. (2015). Behavioral flexibility in rats and mice: Contributions of distinct frontocortical regions. *Genes, Brain, and Behavior*, 14(1), 4. <https://doi.org/10.1111/GBB.12191>

Harburger, L. L., Lambert, T. J., & Frick, K. M. (2007). Age-Dependent Effects of Environmental Enrichment on Spatial Reference Memory in Male Mice. *Behavioural Brain Research*, 185(1), 43. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2007.07.009>

Harada, C. N., Natelson Love, M. C. & Triebel, K. L. (2013). Normal cognitive aging. *Clinics in Geriatric Medicine*, 29(4), 737–752. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.002>

Haxaire, C., Turpin, F. R., Potier, B., Kervern, M., Sinet, P. M., Barbanel, G., Mothet, J. P., Dutar, P. & Billard, J. M. (2012). Reversal of age-related oxidative stress prevents hippocampal synaptic plasticity deficits by protecting d-serine-dependent NMDA receptor activation. *Aging Cell*, 11(2), 336–344. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00792.x>

Horio, M., Kohno, M., Fujita, Y., Ishima, T., Inoue, R., Mori, H., & Hashimoto, K. (2011). Levels of D-serine in the brain and peripheral organs of serine racemase (Srr) knock-out mice. *Neurochemistry international*, 59(6), 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.08.017>

Idris, N. F., Repeto, P., Neill, J. C., & Large, C. H. (2005). Investigation of the effects of lamotrigine and clozapine in improving reversal-learning impairments induced by acute phencyclidine and D-amphetamine in the rat. *Psychopharmacology*, 179(2), 336–348. <https://doi.org/10.1007/S00213-004-2058-5/FIGURES/8>

Izquierdo, A., Brigman, J. L., Radke, A. K., Rudebeck, P. H., & Holmes, A. (2017a). The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience*, 345, 12. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2016.03.021>

Izquierdo, A., Brigman, J. L., Radke, A. K., Rudebeck, P. H., & Holmes, A. (2017b). The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience*, 345, 12. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2016.03.021>

Izquierdo, A., & Jentsch, J. D. (2012). Reversal learning as a measure of impulsive and compulsive behavior in addictions. *Psychopharmacology*, 219(2), 607. <https://doi.org/10.1007/S00213-011-2579-7>

Jarvers, C., Brosch, T., Brechmann, A., Woldeit, M. L., Schulz, A. L., Ohl, F. W., Lommerzheim, M., & Neumann, H. (2016). Reversal learning in humans and gerbils: Dynamic control network facilitates learning. *Frontiers in Neuroscience*, 10(NOV), 535. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2016.00535/BIBTEX>

Junjaud, G., Rouaud, E., Turpin, F., Mothet, J. P., & Billard, J. M. (2006). Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 98(4), 1159–1166. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.03944.X>

Kantrowitz, J. T., Epstein, M. L., Lee, M., Lehrfeld, N., Nolan, K. A., Shope, C., Petkova, E., Silipo, G., & Javitt, D. C. (2018). Improvement in mismatch negativity generation during d-serine treatment in schizophrenia: Correlation with symptoms. *Schizophrenia Research*, 191, 70–79. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2017.02.027>

Kantrowitz, J. T., Malhotra, A. K., Cornblatt, B., Silipo, G., Balla, A., Suckow, R. F., D'Souza, C., Saksa, J., Woods, S. W., & Javitt, D. C. (2010). High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 121(1–3), 125–130. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2010.05.012>

Kantrowitz, J. T., Woods, S. W., Petkova, E., Cornblatt, B., Corcoran, C. M., Chen, H., Silipo, G., & Javitt, D. C. (2015). D-serine for the treatment of negative symptoms in individuals at clinical high risk of schizophrenia: a pilot, double-blind, placebo-controlled, randomised parallel group mechanistic proof-of-concept trial. *The Lancet Psychiatry*, 2(5), 403–412. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00098-X)

Kolb, B., Gorny, G., Söderpalm, A. H. V., & Robinson, T. E. (2003). Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse*, 48(3), 149–153. <https://doi.org/10.1002/SYN.10196>

Kumar, A., Rani, A., Tchigranova, O., Lee, W. H., & Foster, T. C. (2012). Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiology of Aging*, 33(4), 828.e1-828.e17. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2011.06.023>

Labrie, V., & Roder, J. C. (2010). The involvement of the NMDA receptor d-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(3), 351–372. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2009.08.002>

Laclair, M., Febo, M., Nephew, B., Gervais, N. J., Poirier, G., Workman, K.,

Chumachenko, S., Payne, L., Moore, M. C., King, J. A., & Lacreuse, A. (2019). Sex Differences in Cognitive Flexibility and Resting Brain Networks in Middle-Aged Marmosets. *ENeuro*, 6(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0154-19.2019>

Lalo, U., Bogdanov, A., & Pankratov, Y. (2018). Diversity of Astroglial Effects on Aging-And Experience-Related Cortical Metaplasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 239. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00239/BIBTEX>

MacKay, M. A. B., Kravtsenyuk, M., Thomas, R., Mitchell, N. D., Dursun, S. M., & Baker, G. B. (2019). D-serine: Potential therapeutic agent and/or biomarker in schizophrenia and depression? *Frontiers in Psychiatry*, 10(FEB), 25. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2019.00025/BIBTEX>

Magnusson, K. R. (2012). Aging of the NMDA receptor: from a mouse's point of view. *Future Neurology*, 7(5), 627. <https://doi.org/10.2217/FNL.12.54>

McKee, B. L., Kelley, A. E., Moser, H. R., & Andrzejewski, M. E. (2010). Operant learning requires NMDA-receptor activation in the anterior cingulate cortex and dorsomedial striatum, but not in the orbitofrontal cortex. *Behavioral Neuroscience*, 124(4), 500–509. <https://doi.org/10.1037/A0020270>

McLean, S. L., Neill, J. C., Idris, N. F., Marston, H. M., Wong, E. H. F., & Shahid, M. (2010). Effects of asenapine, olanzapine, and risperidone on psychotomimetic-induced reversal-learning deficits in the rat. *Behavioural Brain Research*, 214(2), 240–247. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2010.05.043>

McQuail, J. A., Beas, B. S., Kelly, K. B., Hernandez, C. M., Bizon, J. L., & Frazier, C. J. (2021). Attenuated NMDAR signaling on fast-spiking interneurons in prefrontal cortex contributes to age-related decline of cognitive flexibility. *Neuropharmacology*, 197, 108720. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2021.108720>

Milham MP, Erickson KI, Banich MT, Kramer AF, Webb A, Wszalek T, Cohen NJ. Attentional control in the aging brain: insights from an fMRI study of the stroop task. *Brain Cogn.* 2002 Aug;49(3):277-96. doi: 10.1006/brcg.2001.1501. PMID: 12139955.

Mitchell, J., Paul, P., Chen, H. J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M., Habgood, J., Panoutsou, S., Winkler, S., Tisato, V., Hajitou, A., Smith, B., Vance, C., Shaw, C., Mazarakis, N. D., & de Belleruche, J. (2010). Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7556–7561. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914128107>

Mizoguchi, K., Shoji, H., Tanaka, Y., & Tabira, T. (2010). Orbitofrontal dopaminergic dysfunction causes age-related impairment of reversal learning in rats. *Neuroscience*, 170(4), 1110–1119.

Moore, T. L., Killiany, R. J., Herndon, J. G., Rosene, D. L., & Moss, M. B. (2006). Executive system dysfunction occurs as early as middle-age in the rhesus monkey. *Neurobiology of aging*, 27(10), 1484–1493.

Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr, Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A., & Snyder, S. H. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4926–4931. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4926>

Muir J. L. (1996). Attention and stimulus processing in the rat. *Brain research. Cognitive brain research*, 3(3-4), 215–225. [https://doi.org/10.1016/0926-6410\(96\)00008-0](https://doi.org/10.1016/0926-6410(96)00008-0)

Murphy, E. R., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2005). Local glutamate receptor antagonism in the rat prefrontal cortex disrupts response inhibition in a visuospatial

attentional task. *Psychopharmacology*, 179(1), 99–107.
<https://doi.org/10.1007/s00213-004-2068-3>

Nava-Gómez, L., Calero-Vargas, I., Higinio-Rodríguez, F., Vázquez-Prieto, B., Olivares-Moreno, R., Ortiz-Retana, J., Aranda, P., Hernández-Chan, N., Rojas-Piloni, G., Alcauter, S., & López-Hidalgo, M. (2022). AGING-ASSOCIATED COGNITIVE DECLINE IS REVERSED BY D-SERINE SUPPLEMENTATION. *ENeuro*, ENEURO.0176-22.2022.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0176-22.2022>

Nicolle, M. M., & Baxter, M. G. (2003). Glutamate receptor binding in the frontal cortex and dorsal striatum of aged rats with impaired attentional set-shifting. *The European journal of neuroscience*, 18(12), 3335–3342. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03077>.

Nomura, M., Izaki, Y., Takita, M., Tanaka, J., & Hori, K. (2004). Extracellular level of basolateral amygdalar dopamine responding to reversal of appetitive-conditioned discrimination in young and old rats. *Brain Research*, 1018(2), 241–246.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2004.05.077>

Otte, D. M., Barcena de Arellano, M. L., Bilkei-Gorzo, A., Albayram, Ö., Imbeault, S., Jeung, H., Alferink, J., & Zimmer, A. (2013). Effects of Chronic D-Serine Elevation on Animal Models of Depression and Anxiety-Related Behavior. *PLoS ONE*, 8(6).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0067131>

Palmer, A. L. & Ousman, S. S. (2018). Astrocytes and Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 337. 10.3389/fnagi.2018.00337

Pannese, E. (2011). Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain Structure and Function*, 216(2), 85–89. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0308-y>

Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L.,

Pollegioni, L., Mothet, J. P., & Oliet, S. H. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, 150(3), 633–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.029>

Pernot, P., Maucler, C., Tholance, Y., Vasylieva, N., Debilly, G., Pollegioni, L., Cespuglio, R., & Marinesco, S. (2012). d-Serine diffusion through the blood-brain barrier: effect on d-serine compartmentalization and storage. *Neurochemistry international*, 60(8), 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.03.008>

Pehrson, A. L., Bondi, C. O., Totah, N. K., & Moghaddam, B. (2013). The influence of NMDA and GABA(A) receptors and glutamic acid decarboxylase (GAD) activity on attention. *Psychopharmacology*, 225(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2792-z>

Peters, R. (2006). Ageing and the brain. *Postgraduate Medical Journal*, 82(964), 84– 88. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.036665>

Peters, R. (2006). Ageing and the brain. *Postgraduate Medical Journal*, 82(964), 84– 88. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.036665>

Robbins T. W. (2002). The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*, 163(3-4), 362– 380. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1154-7>

Rogers, R. D., Baunez, C., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2001). Lesions of the medial and lateral striatum in the rat produce differential deficits in attentional performance. *Behavioral neuroscience*, 115(4), 799–811. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.115.4.799>

Portero-Tresserra, M., Martí-Nicolovius, M., Tarrés-Gatius, M., Candalija, A., Guillazo-Blanch, G., & Vale-Martínez, A. (s/f). Intra-hippocampal D-cycloserine rescues decreased social memory, spatial learning reversal, and synaptophysin levels in aged rats.

<https://doi.org/10.1007/s00213-018-4858-z>

Rosenzweig, M. R., & Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*, 78(1), 57–65. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00216-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00216-2)

Rountree-Harrison, D., Burton, T. J., Leamey, C. A., & Sawatari, A. (2018). Environmental Enrichment Expedites Acquisition and Improves Flexibility on a Temporal Sequencing Task in Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2018.00051>

Sacchi, S., Rosini, E., Pollegioni, L. & Molla, G. (2013). D-Amino Acid Oxidase Inhibitors as a Novel Class of Drugs for Schizophrenia Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 19(14), 2499-2511. <https://doi.org/10.2174/1381612811319140002>

Sampedro-Piquero, P., Begega, A., Zancada-Menendez, C., Cuesta, M., & Arias, J. L. (2013). Age-dependent effects of environmental enrichment on brain networks and spatial memory in Wistar rats. *Neuroscience*, 248, 43–53. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.06.003>

Sampedro-Piquero, P., de Bartolo, P., Petrosini, L., Zancada-Menendez, C., Arias, J. L., & Begega, A. (2014). Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 114, 16–25. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2014.04.002>

Sampedro-Piquero, P., Zancada-Menendez, C., & Begega, A. (2015). Housing condition-related changes involved in reversal learning and its c-Fos associated activity in the prefrontal cortex. *Neuroscience*, 307, 14–25. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.08.038>

Samson, R. D., Venkatesh, A., Patel, D. H., Lipa, P., & Barnes, C. A. (2014). Enhanced performance of aged rats in contingency degradation and instrumental extinction tasks.

Behavioral Neuroscience, 128(2), 122. <https://doi.org/10.1037/A0035986>

Sander, M., Oxlund, B., Jespersen, A., Krasnik, A., Mortensen, E. L., Westendorp, R. G. & Rasmussen, L. J. (2015). The challenges of human population ageing. *Age and Ageing*, 44(2), 185–187. <https://doi.org/10.1093/ageing/afu189>

Sasabe, J., Miyoshi, Y., Suzuki, M., Mita, M., Konno, R., Matsuoka, M., Hamase, K., & Aiso, S. (2012). D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 627–632. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114639109>

Scahill, R. I., Frost, C., Jenkins, R., Whitwell, J. L., Rossor, M. N. & Fox, N. C. (2003). A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Archives of Neurology*, 60(7), 989-94. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.7.989>

Schell, M. J., Molliver, M. E., & Snyder, S. H. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3948–3952. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3948>

Schrijver, N. C. A., Pallier, P. N., Brown, V. J., & Würbel, H. (2004). Double dissociation of social and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 152(2), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.016>

Serra, L. & Gelfo, F. (2019). What good is the reserve? A translational perspective for the managing of cognitive decline. *Neural Regeneration Research*, 14(7), 1219- 1220 [10.4103/1673-5374.251328](https://doi.org/10.4103/1673-5374.251328)

Serra, L., Gelfo, F., Petrosini, L., Di Domenico, C., Bozzali, M. & Caltagirone, C. (2018). Rethinking the reserve with a translational approach: Novel ideas on the construct and

the interventions. *Journal of Alzheimer's Disease*, 65(4), 1065–1078.
<https://doi.org/10.3233/JAD-180609>

Shimazaki, T., Kaku, A., & Chaki, S. (2010). D-Serine and a glycine transporter-1 inhibitor enhance social memory in rats. *Psychopharmacology*, 209(3), 263–270.
<https://doi.org/10.1007/s00213-010-1794-y>

Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., & Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain* 2016 9:1, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S13041-016-0191-9>

Stalnaker, T. A., Takahashi, Y., Roesch, M. R., & Schoenbaum, G. (2009). Neural Substrates of Cognitive Inflexibility after Chronic Cocaine Exposure. *Neuropharmacology*, 56(Suppl 1), 63. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.07.019>

Sotoudeh, N., Namavar, M. R., Zarifkar, A. & Heidarzaghan, A. R. (2020). Age-dependent changes in the medial prefrontal cortex and medial amygdala structure, and elevated plus-maze performance in the healthy male Wistar rats. *IBRO Reports*, 9, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.08.002>

Stern, Y. (2017). An approach to studying the neural correlates of reserve. *Brain Imaging and Behavior*, 11(2), 410-416. [10.1007/s11682-016-9566-x](https://doi.org/10.1007/s11682-016-9566-x)

Stern, Y., Arenaza-Urquijo, E. M., Bartrés-Faz, D., Belleville, S., Cantilon, M., Chetelat, G., Ewers, M., Franzmeier, N., Kempermann, G., Kremen, W. S., Okonkwo, O., Scarmeas, N., Soldan, A., Udeh-Momoh, C., Valenzuela, M., Vemuri, P. & Vuoksimaa, E. (2020). Whitepaper: defining and investigating cognitive reserve, brain reserve, and brain maintenance. *Alzheimer's and Dementia: the journal of Alzheimer's Association*, 16(9), 1305-1311. doi: [10.1016/j.jalz.2018.07.21](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.07.21)

Pinto C & Tandel K.Y,(2016). Cognitive reserve: Concept, determinants, and promotion. *J Geriatr Ment Health*.3, 44-51

Thomsen, T., Specht, K., Rimol, L. M., Hammar, A., Nytingnes, J., Ersland, L., & Hugdahl, K. (2004). Brain localization of attentional control in different age groups by combining functional and structural MRI. *NeuroImage*, 22(2), 912–919. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.02.015>

Trollor, J. N. & Valenzuela, M. J. (2001). Brain ageing in the new millennium. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 35(6), 788-805. doi: 10.1046/j.1440-1614.2001.00969.x

Turpin, F. R., Potier, B., Dulong, J. R., Sinet, P. M., Alliot, J., Oliet, S. H., Dutar, P., Epelbaum, J., Mothet, J. P., & Billard, J. M. (2011). Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiology of aging*, 32(8), 1495–1504. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.001>

van Groen, T., Kadish, I., & Wyss, J. M. (2002). Old rats remember old tricks; memories of the water maze persist for 12 months. *Behavioural Brain Research*, 136(1), 247–255. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00137-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00137-7)

Van-Horn, M. R., Sild, M., & Ruthazer, E. S. (2013). D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0(MAR), 39. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00039/BIBTEX>

Varangis, E., Habeck, C. G., Razlighi, Q. R., & Stern, Y. (2019). The Effect of Aging on Resting State Connectivity of Predefined Networks in the Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 234. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2019.00234/BIBTEX>

Verrall, L., Walker, M., Rawlings, N., Benzel, I., Kew, J. N., Harrison, P. J., & Burnet, P. W. (2007). d-Amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *The European journal of neuroscience*, 26(6), 1657–1669. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05769.x>

Woodard, J. L., Sugarman, M. A., Woodard, J. L., Sugarman, M. A., Springer, Ó., & Berlin, V. (2011). Functional Magnetic Resonance Imaging in Aging and Dementia: Detection of Age-Related Cognitive Changes and Prediction of Cognitive Decline. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 10, 113–136. https://doi.org/10.1007/7854_2011_159

Wolosker, H., Sheth, K. N., Takahashi, M., Mothet, J. P., Brady, R. O., Jr, Ferris, C. D. & Snyder, S. H. (1999). Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 721–725. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.721>

Zeleznikow-Johnston, A., Burrows, E. L., Renoir, T., & Hannan, A. J. (2017). Environmental enrichment enhances cognitive flexibility in C57BL/6 mice on a touchscreen reversal learning task. *Neuropharmacology*, 117, 219–226. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2017.02.009>

Zeleznikow-Johnston, A. M., Burrows, E. L., Renoir, T., Hannan, A. J., Zeleznikow-Johnston, A. M., Burrows, E. L., Renoir, Á. T., Hannan, Á. A. J., & Hannan, A. J. (2017). Translatable Models of Brain and Cognitive Reserve. *Contemporary Clinical Neuroscience*, 79–104. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52067-4_4

Zhang, Z., Gong, N., Wang, W., Xu, L., & Xu, T. le. (2008). Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 18(10), 2391–2401. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHN008>

Zhou, X., Hollern, D., Liao, J., Andrechek, E., & Wang, H. (2013). NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell death & disease*, 4(3), e560. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.82>

Zorumski, C. F., & Izumi, Y. (2012). NMDA Receptors and Metaplasticity: Mechanisms and Possible Roles in Neuropsychiatric Disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(3), 989. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2011.12.011>

