



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE NEURONAS CORTICOESPINALES
DE LA CORTEZA SENSORIOMOTORA EN EL MODELO MURINO
(3xTg-AD) PARA EL ALZHEIMER**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
Martín Macías Ramírez

TUTOR
Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Instituto de Neurobiología, UNAM

COMITÉ TUTOR
Dr. José Gerardo Rojas Piloni
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dra. María Rosa Ávila Costa
Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, UNAM

Juriquilla, Querétaro, Septiembre 2019



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Juan Pérez, cuyo título es: "Caracterización morfométrica de neuronas corticoespinales de la corteza sensoriomotora en el modelo murino (3xTg-AD) para el Alzheimer" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Jorge Larriva Sahd

Secretario (Tutor)

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Vocal

Dra. Claudia Cruz Pérez

Suplente

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Suplente

Dra. Araceli Díaz Ruíz

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de “Neuromorfometría y Desarrollo” (C-02), en el Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión de la Dra. Titular, Investigadora del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel III, Sofía Yolanda Díaz Miranda.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**) y al Instituto de Neurobiología (**INB**), en particular, a mi tutora, la **Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda** por permitirme continuar con mi formación académica en este ámbito de la investigación científica y por continuar demostrándome que la constancia siempre será fundamental en el quehacer científico al momento de experimentar y buscar explicaciones.

A mi Comité Tutor, conformado por el **Dr. José Gerardo Rojas Piloni** y por la **Dra. María Rosa Ávila Costa**, por sus puntuales observaciones y aportaciones para el correcto desarrollo y enriquecimiento de este proyecto de investigación.

A mi Jurado de Examen, integrado por la **Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda**, el **Dr. José Gerardo Rojas Piloni**, el **Dr. Jorge Larriva Sahd**, la **Dra. Araceli Díaz Ruiz** y la **Dra. Claudia Pérez Cruz**, por las observaciones, revisiones y comentarios hechos en beneficio y mejoramiento de este trabajo.

Al **Dr. Rafael Olivares Moreno** por su guía y apoyo en la realización de las cirugías estereotáxicas para la inyección del trazador y en la adquisición de imágenes para el análisis morfométrico.

A la **M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez** por el apoyo técnico y recomendaciones para la correcta realización de las técnicas histológicas del proyecto de investigación.

A la **Dra. Erika María Orta Salazar** por su interés en este proyecto, así como por su apoyo, guía y consejos en la ejecución de las pruebas conductuales y métodos histológicos.

Al técnico **Jorge Abraham Servín de la Cruz** por su apoyo técnico en el laboratorio.

A las entidades que contribuyeron con la financiación:

- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo al proyecto de investigación (CB-2255399), en particular por el apoyo sustantivo de la Beca para Estudios de Posgrado que me fue otorgada (Nº de Apoyo: 479778, Nº de Registro Becario: 629833).
- A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** y su **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT)** por el apoyo al proyecto de investigación (IN204519).

A las Unidades del Instituto de Neurobiología:

- A la **Unidad de Análisis Conductual**, en particular a la **Dra. Deisy Gasca Martínez**, por su apoyo y atención para el óptimo manejo de los aparatos y software informático Omnitech Electronics en las pruebas de campo abierto.
- A la **Unidad de Microscopía**, en particular a la **Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos**, por su apoyo, consejos y atención para la correcta utilización de los microscopios Confocal Zeiss LSM 780 DUO y de fluorescencia Zeiss Apotome en la toma de imágenes.
- A la **Unidad de Enseñanza**, a la **M. en C. Leonor Casanova Rico**, a la **Dra. Nuri Aranda López**, a las secretarías: **Carmen Mendoza López y Guadalupe Amador Uribe**, por sus apoyos en los trámites académico administrativos.
- Al **Laboratorio Universitario de Bioterio**, al **M.V.Z. José Martín García Servín** y a la **Dra. Alejandra Castilla León**, por el cuidado y suministro de los ratones.
- A la **Unidad de Videoconferencia**, a la **Lic. María de Lourdes Lara Ayala**, por su constante vigilancia en el establecimiento de la comunicación para los exámenes tutorales.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia núcleo, Martín, Claudia, Fátima y Sebastián.
Porque la confianza y el apoyo se forjan con el paso del tiempo.

A mis abuelos.
Porque la sabiduría de una vida trasciende más allá de la misma.

A mis amigos.
Porque la familia no sólo son lazos de sangre.

*A todo ser que, a pesar de
la distancia, el tiempo y la realidad,
sigue conmigo.*

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común y está caracterizada por déficits cognitivos acompañados de deficiencias motoras. El control motor está relacionado con la ejecución del movimiento e involucra a las neuronas corticoespinales (CSp), las cuales se localizan en la capa V de la corteza sensoriomotora (SM) e inervan a la médula espinal. En este trabajo, investigamos posibles cambios en estas neuronas provocados por la EA asociados al comportamiento locomotor, usando el modelo de ratón 3xTg-AD. Los resultados en machos y hembras muestran que, en la prueba de campo abierto, las variables como la distancia total, el tiempo de reposo, el número de episodios de reposo, número de episodios verticales, tiempo de movimiento vertical y velocidad promedio en el grupo 3xTg-AD fueron significativamente diferentes cuando son comparados con el grupo no transgénico (No-Tg). Además, los ratones 3xTg-AD mostraron cambios diferenciales por sexo en relación a sus respectivos grupos control (No-Tg). Las hembras 3xTg-AD tuvieron un mayor nivel de actividad y exploración que los machos 3xTg-AD, cuyo nivel fue menor. La caracterización morfométrica de las neuronas CSp fue diferente entre los grupos: los ratones machos 3xTg-AD mostraron mayor tamaño en el soma y núcleo en relación a las CSp de los machos No-Tg. Las neuronas CSp de las hembras 3xTg-AD tuvieron menor tamaño del soma y núcleo en relación a las hembras No-Tg. En general, estos hallazgos proveen una evidencia directa de que las alteraciones de la morfología celular se relacionan con el comportamiento locomotor en el modelo 3xTg-AD, y sugieren que las neuronas CSp juegan un papel en la disfunción motora durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, corteza sensoriomotora, neuronas corticoespinales, actividad locomotora, morfometría

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia and is characterized by cognitive deficits accompanied with motor deficiencies. Motor control is related with the execution of movement and involves corticospinal neurons (CSp), which are located in layer V of the sensorimotor cortex (SM) and innervate the spinal cord. In this work, we investigated if possible changes in this neurons caused by AD and associated with locomotor behavior, in the 3xTg-AD mouse model. The results in 3xTg-AD males and females show that, in open field test, variables such as total distance, rest time, rest episode count, vertical episode count, vertical movement time and average velocity were significantly different when compared to the non-transgenic groups (No-Tg) groups. In addition, 3xTg-AD mice showed differential changes by sex in relation to their respective control groups (No-Tg). 3xTg-AD females showed a higher activity level and exploration than 3xTg-AD males, whose their level was lower. The morphometric characterization of CSp neurons was different between the groups: 3xTg-AD males showed larger size in the soma and nucleus in relation to the CSp of No-Tg males. The CSp neurons of 3xTg-AD females had smaller size of soma and nucleus in relation to the No-Tg females. In general, these findings provide a direct evidence that alterations in cell morphology are related to locomotor behavior in the 3xTg-AD model, and suggests that CSp neurons play a role in motor dysfunction during Alzheimer's disease progression.

Key words: Alzheimer' disease, sensorimotor cortex, corticospinal neurons, locomotor activity, morphometry

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 La enfermedad de Alzheimer (EA)	2
2.2 Marcadores neuropatológicos de la EA	3
2.2.1 Beta amiloide (β A)	4
2.2.2 Proteína Tau	5
2.3 Modelos murinos para el estudio del Alzheimer	6
2.4 Modelo transgénico 3xTg-AD para el estudio de la EA	8
2.5 Función motora y la EA	9
2.6 Control motor	10
2.7 Corteza sensoriomotora	11
3. Justificación	14
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	14
5.1 General	14
5.2 Particulares	15
6. Sujetos, Material y Métodos	15
6.1 Animales	15
6.2 Estudio conductual	15
6.3 Inyección del trazador retrógrada	16
6.4 Fijación y procesamiento histológico	16
6.5 Adquisición de imágenes y análisis morfométrico de neuronas CSp	17
6.6 Análisis estadístico	17
7. Resultados	18
7.1 Estudio conductual entre condiciones	18
7.2 Estudio conductual entre sexos	21
7.3 Marcaje fluorescente de neuronas CSp	24

7.4 Diámetros del soma, núcleo y nucléolo de las neuronas CSp entre condiciones	25
7.5 Diámetro del soma, núcleo y nucléolo de las neuronas CSp entre sexos	30
8. Discusión	32
8.1 Análisis conductual entre condiciones	32
8.2 Análisis conductual entre sexos	35
8.3 Análisis morfométrico	36
9. Conclusiones y Perspectivas	40
10. Literatura citada	41
11. Índice de figuras	51
12. Índice de tablas	52

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común y está caracterizada por el deterioro de las funciones cognitivas en el ser humano (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2015). Los cerebros con EA presentan dos tipos de lesiones: las placas amiloides constituidas por péptidos de beta amiloide (βA) y las marañas neurofibrilares conformadas por agregados de la proteína Tau anormalmente fosforilada (Iqbal et al., 2005). Aunque el péptido βA se asocia a la EA, tiene actividades no asociadas a la misma, como son la activación de cinasas, protección al estrés oxidativo, regulación del colesterol y actividad anti microbiana (Lahiri & Maloney, 2010). Por lo que solo las formas oligoméricas del péptido, y en especial el fragmento 42 (βA_{42}) se identifica como tóxico debido a que, al aglomerarse en forma de placas seniles o amiloideas, pueden ser las causas del desarrollo de la demencia propia de la EA (De-Paula et al., 2012; Mazzitelli et al., 2016). Se ha considerado a la fosforilación anormal (hiperfosforilación) de la proteína Tau como uno de los factores de riesgo para el desarrollo de la EA debido a que ello deriva en la formación de las marañas neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés) características de la enfermedad (Mohandas et al., 2009). Estos marcadores neuropatológicos se replican en modelos experimentales como el ratón transgénico 3xTg-AD que contiene tres mutaciones en los genes de la Proteína Precursora del Amiloide (APP_{Swe}), la Presenilina 1 ($PSEN1_{M146V}$) y Tau_{P301L} (Oddo et al., 2003). Este modelo transgénico recapitula gran parte de los aspectos del desarrollo progresivo de la EA debido a que presenta los marcadores neuropatológicos dependiendo de la edad del animal y de estructuras cerebrales específicas (Orta-Salazar et al., 2017). Dentro de las características clínicas, el paciente con la EA, además de presentar deterioro de las funciones cognitivas, muestra alteraciones no cognitivas como en las funciones motoras (Maquet et al., 2010). El control motor en los mamíferos involucra a las cortezas sensorial y motoras, ambas pueden ser diferenciadas entre sí mediante su localización en la corteza frontal, su citoarquitectura y su patrón de conexiones con otras estructuras cerebrales pero están funcional y anatómicamente relacionadas (Young et al., 2012; Hooks, 2017). La corteza sensoriomotora (SM) controla la ejecución del movimiento a

través de las neuronas de proyección que residen en la capa V que tienen inervaciones hacia estructuras subcorticales como la proyección de las neuronas corticoespinales (CSp) para el control motor por el tracto corticoespinal (Olivares-Moreno et al., 2017).

2. Antecedentes

2.1 La enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es el tipo de demencia más común y está caracterizada por el deterioro de las funciones cognitivas en el ser humano (INNN, 2010; OMS, 2015). El primer antecedente de esta patología data del año 1907 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer, quien reportó en una mujer de 51 años (Auguste Deter) desde deficiencias en la memoria, en el lenguaje y desorientación hasta comportamiento impredecible y deterioro psicosocial (Alzheimer, 1907; Alzheimer et al., 1995; Maurer et al., 1997; Fig. 1).

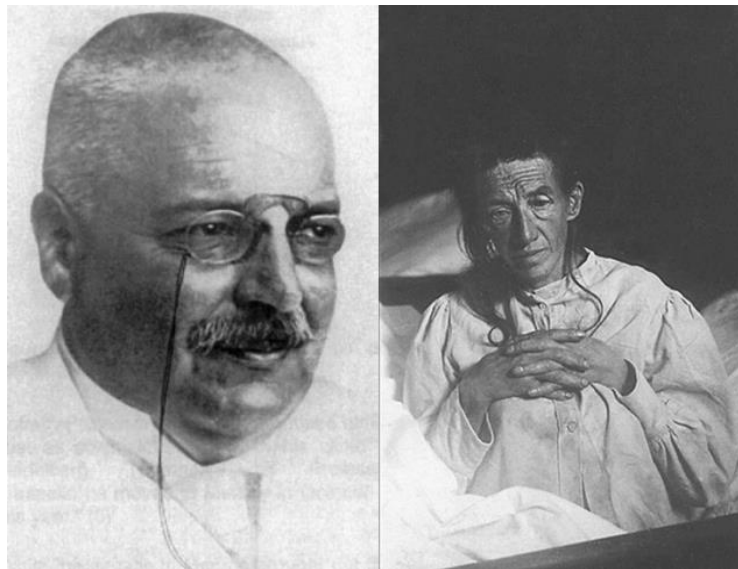


Figura 1. La Enfermedad de Alzheimer fue diagnosticada en 1907 por Alois Alzheimer (izquierda) en la paciente Auguste Deter (derecha) (Modificado de Goedert y Ghetti, 2007; Engelhardt & Gomes Mda, 2015).

Desde entonces la EA ha adquirido gran importancia a nivel mundial debido a que su prevalencia es proporcional a la expectativa de vida del paciente (Brookmeyer et al., 2002; Zanetti et al., 2009). Según estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y Alzheimer's Disease International, en el mundo existen alrededor

de 46.8 - 47.5 millones de personas con demencia, entre las cuales del 60 al 80 % presenta la EA (Alzheimer's Association, 2015a; OMS, 2015; Prince et al., 2015) y cuya esperanza de vida varía entre 3 y 10 años (Xie et al., 2008; Zanetti et al., 2009). Las proyecciones a futuro prevén que para el año 2030 habrá más de 70 millones de personas con demencia y para el año 2050 más de 130 millones; esto conlleva a que la calidad de vida de la persona con demencia y de sus familiares se vea afectada de manera severa (Prince et al., 2015).

2.2 Marcadores neuropatológicos de la EA

Neuropatológicamente los cerebros con EA presentan dos tipos de lesiones: las marañas neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés) conformadas por agregados de la proteína Tau fosforilada de manera anormal (Iqbal et al., 2005; Ross & Poirier, 2004; Fig. 2) y las placas amiloides constituidas por péptidos de beta amiloide (β A). Aunque en estudios recientes se sabe que este péptido tienen funciones importantes no asociadas a la EA, como son la activación de las cinasas, protección al estrés oxidativo, regulación del colesterol y actividad anti microbiana, en especial de las bacterias asociadas a la inflamación (Lahiri & Maloney, 2010). Por lo que sólo las formas oligoméricas del péptido: β A (1-40), (1-42) y (25-35) y en especial la variante 42, (β A₄₂) se le identifica como tóxico debido a que, al aglomerarse en forma de placas seniles o amiloideas, pueden ser los factores causales del desarrollo de la demencia propia de la EA (De-Paula et al., 2012; Mazzitelli et al., 2016). El fragmento, β A₄₂ puede causar los defectos fenotípicos incluso en ausencia de mutaciones genéticas asociadas con la EA, lo que posiblemente contribuye al desarrollo de la forma esporádica de la patología (Lahiri & Maloney, 2010).

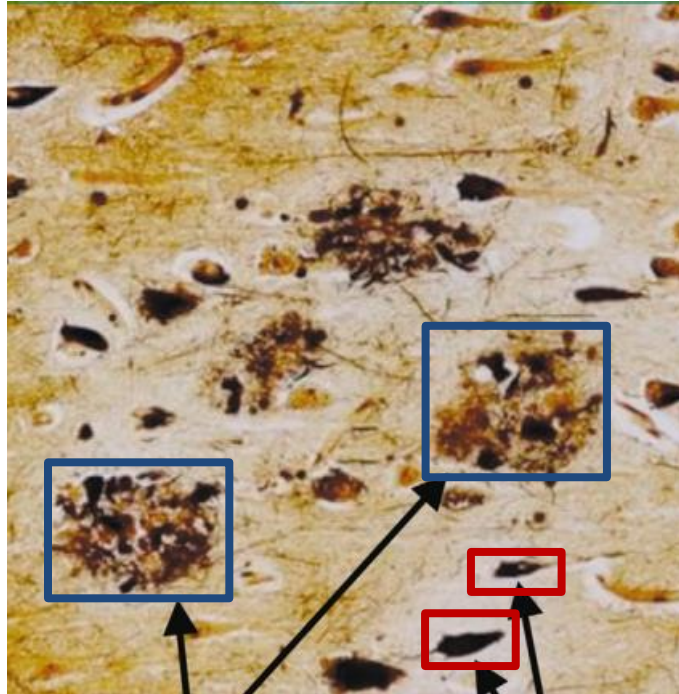


Figura 2. Placas amiloides de βA (recuadros azules) y las marañas neurofibrilares de Tau (recuadros rojos) visualizadas en la corteza cerebral humana de un cerebro que padeció la EA (Modificado de Blennow et al., 2006).

2.2.1 Beta amiloide (βA)

El péptido βA es el producto de la digestión proteolítica de la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés). Los procesos enzimáticos responsables del metabolismo de APP para formar βA se han ido esclareciendo con el paso de los años. La APP es cortada de manera secuencial por dos proteínas con actividad de endoproteasa que se encuentran ancladas en la membrana (βA y γ -secretasas), dando como resultado un péptido de 36 a 43 aminoácidos; este proceso es conocido como la vía amiloidogénica (Mazzitelli et al., 2016). Las formas más comunes están formadas por 40 (βA_{40}) y 42 (βA_{42}) aminoácidos, siendo la βA_{42} la forma más tóxica debido a que, al aglomerarse en forma de placas seniles o amiloides, puede causar daños al cerebro que deriven en la demencia propia de la EA (Selkoe, 1991; Hardy & Selkoe, 2002; Karran et al., 2011; De-Paula et al., 2012; Fig. 3).

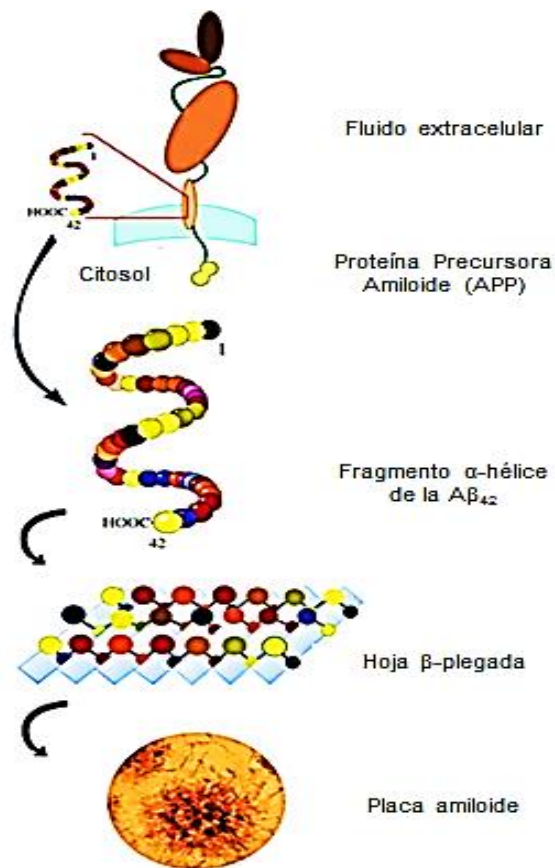


Figura 3. Desarrollo de las placas amiloides características de la EA. La APP produce, de manera normal, fragmentos de βA_{42} con conformación α -hélice; cuando su conformación cambia a β -plegada, la βA_{42} se oligomeriza dando lugar al surgimiento de placas amiloides (Modificado de Cox et al., 2016).

2.2.2 Proteína Tau

La proteína Tau, descrita por la capacidad de asociación a los microtúbulos (MAP, por sus siglas en inglés), cumple la función de promover el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos y estabilizarlos (Weingarten et al., 1975; Mandelkow y Mandelkow, 2012). Se ha considerado a la fosforilación anormal (hiperfosforilación) de Tau como uno de los factores de riesgo para el desarrollo de la EA debido a que ello deriva en la formación de las NFT características de la enfermedad (Iqbal et al., 2005; Mohandas et al., 2009; Fig. 4).

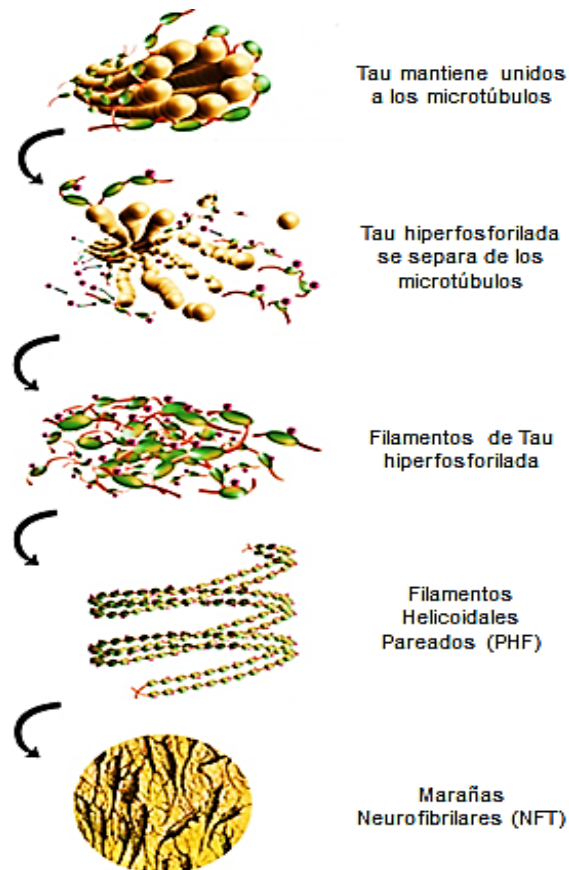


Figura 4. Desarrollo de las marañas neurofibrilares (NFT) en la EA. Normalmente Tau está asociada a microtúbulos pero cuando sufre una anormal fosforilación se disocia de ellos, aglomerándose para formar Filamentos Helicoidales Pareados (PHF, por sus siglas en inglés) y dar origen a las NFT (Modificado de Cox et al., 2016).

2.3 Modelos murinos para el estudio del Alzheimer

Por ser el deterioro cognitivo una característica de la EA, se han desarrollado muchos modelos murinos que recapitulan diferentes aspectos del deterioro cognitivo observado en la EA (Platt et al., 2013). Actualmente, existen más de 160 modelos transgénicos que ayudan a entender el desarrollo de la EA y que varían en función del gen que es mutado o por el número de proteínas alteradas que son sobre-expresadas (Alzforum, 2019b; Fig. 5). De entre estos modelos, el ratón transgénico 3xTg-AD es uno de los más utilizados debido a que se reproduce bien y porque desarrolla la patología de manera gradual acorde a las regiones cerebrales y tiempo de aparición como en el ser humano (Oddo, et al., 2003). Además, la mayoría de los modelos de ratones para la EA utilizados comúnmente exhiben una mayor actividad locomotora (Moretti et al., 2013). Estas alteraciones incluyen hiperactividad, comportamientos estereotipados y

alteraciones de la actividad en la jaula de habitación (Cissé et al., 2011). En la mayoría de los modelos de ratones para la EA, se estudian el perfil de deterioro cognitivo relacionado con esta patología, aunque la función ejecutiva se refiere a una amplia gama de procesos cognitivos superiores tales como: razonamiento, planificación, flexibilidad cognitiva, secuenciación, inhibición de la respuesta y formación de conceptos abstractos. Los actuales modelos de ratón de la función ejecutiva reproducen más los aspectos humanos de la flexibilidad cognitiva y la inhibición de la respuesta en la función ejecutiva y la memoria de trabajo por lo que se utilizan las memorias de tipo laberinto. Estas tareas se basan en el comportamiento exploratorio natural (como la tendencia a elegir un brazo alternativo sobre un brazo que se ha explorado previamente en los laberintos en forma de T y Y) de los roedores (Dudchenko, 2004).

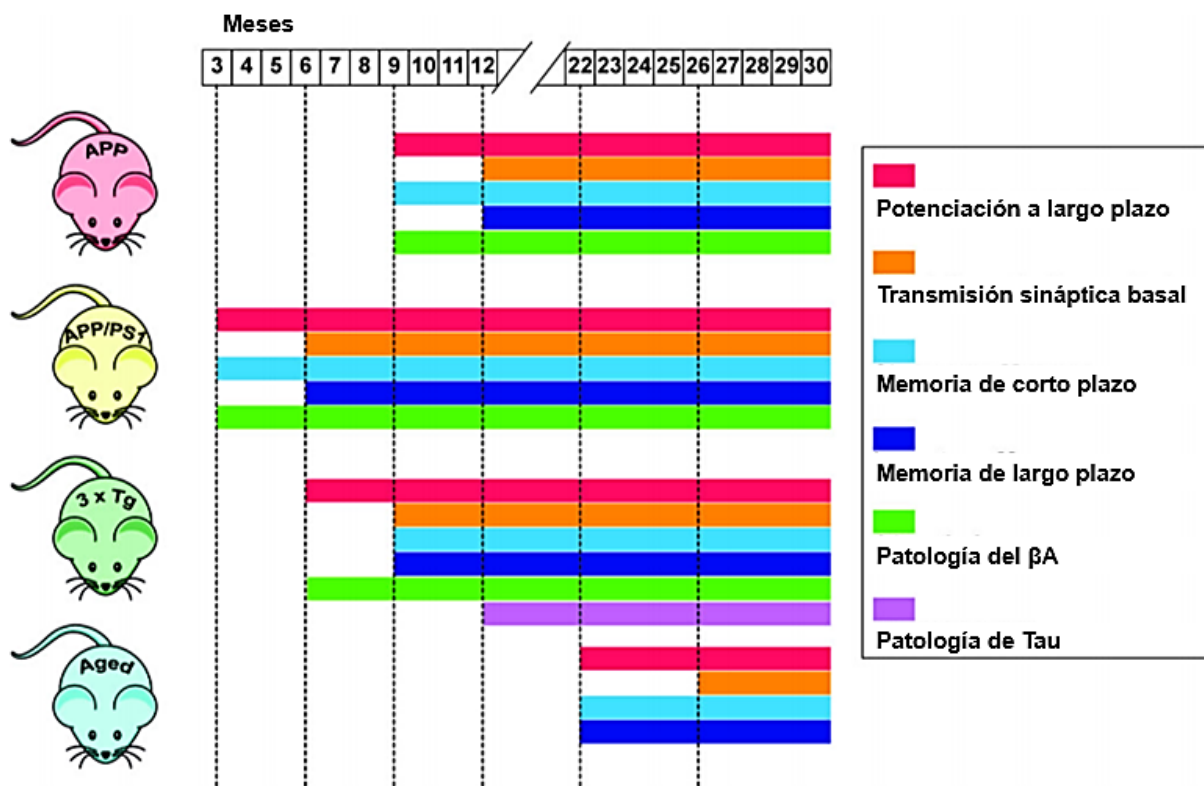


Figura 5. Diagrama cronológico (edad en meses) de 3 modelos transgénicos (APP Tg2576, APP/PS1 y 3xTg-AD) y un modelo fisiológico (senil) comparando el declive sináptico, la pérdida de memoria y los signos de la patología (βA Y Tau) (Modificado de Puzzo et al., 2015).

2.4 Modelo transgénico 3xTg-AD para el estudio de la EA

Los marcadores neuropatológicos de la EA pueden replicarse en modelos experimentales como el ratón triple transgénico 3xTg-AD, el cual presenta tres mutaciones en los genes de la APP_{Swe}, PSEN1_{M146V}, y Tau_{UP301L} (Oddo et al., 2003) que están asociadas con la enfermedad (Selkoe, 1991; Hardy & Selkoe, 2002; Iqbal et al., 2005; Shen & Kelleher, 2007; Mohandas et al., 2009; Karran et al., 2011). Este modelo transgénico recapitula gran parte de los aspectos del desarrollo progresivo de la EA debido a genera placas amiloideas e hiperfosforilación de Tau dependientes de la edad del animal y de estructuras cerebrales específicas (Oddo et al., 2003; Orta-Salazar et al., 2017; Fig. 6).

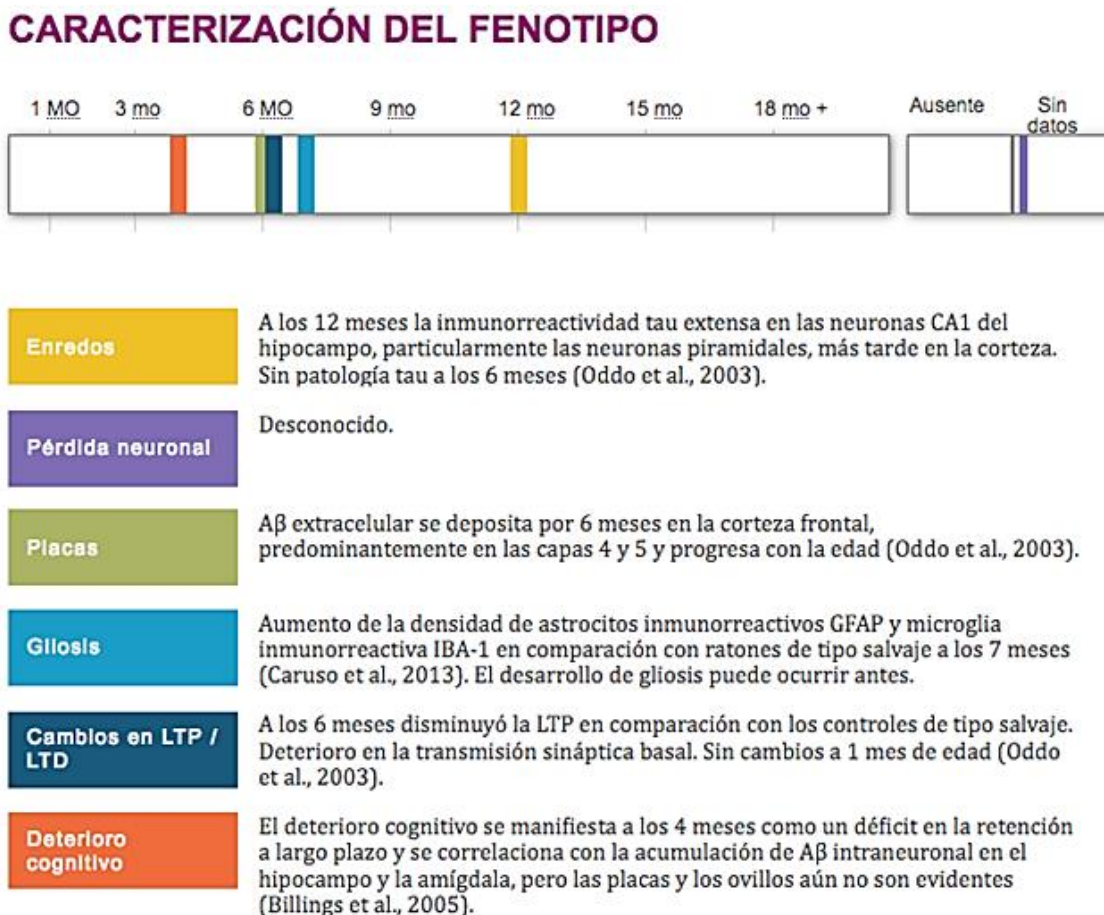


Figura 6. Caracterización del fenotipo del modelo transgénico 3xTg-AD incluyendo diferentes alteraciones reportadas en el curso de la patología tipo Alzheimer (Tomado de Alzforum, 2019a).

2.5 Función motora y la EA

El paciente con la EA, además de presentar deterioro de las funciones cognitivas, muestra alteraciones en las funciones motoras, como lo reportaron Maquet et al. (2010), quienes encontraron modificaciones en la velocidad de la marcha y en la longitud de la zancada al caminar entre pacientes con la EA y Deterioro Cognitivo Leve (MCI, por sus siglas en inglés). Los datos fueron corroborados por Pettersson et al. (2002), quienes encontraron no sólo deficiencias en el patrón de marcha sino también en el nivel de actividad, observándose que los pacientes diagnosticados con EA leve fueron menos activas.

Aun cuando el daño en la capacidad motora se relaciona con las etapas avanzadas de la EA (Alzheimer's Association, 2015b), hay algunos estudios que apuntan a una disfunción motora precediendo al declive cognitivo. Camicioli et al. (1998), al determinar si había diferencias motoras entre sujetos cognitivamente sanos y sujetos que desarrollaron daño cognitivo durante el estudio, concluyeron que la velocidad y la coordinación al caminar se encuentran disminuidas en los sujetos que desarrollaron MCI; Buracchio et al. (2010) encontraron que el declive motor (dado por la velocidad al caminar) se presenta hasta 12 años antes de que la persona padezca MCI, una condición de riesgo para la EA.

Por otra parte, el músculo es el efector final de la salida motora, pero hay estructuras cerebrales relacionadas con el control motor como la corteza motora primaria (M1), en este sentido, Orta-Salazar et al. (2017), utilizando el modelo de ratón triple transgénico 3xTg-AD, mostraron la presencia de alteraciones en M1 durante una etapa intermedia de la progresión de la EA (a los 11 meses de edad), en donde hay disminución en el número de neuronas normales y aumento de neuronas dañadas o anormales además de mostrar astrocitos con signos de reactividad, hipertrofia y aumento del cuerpo celular (Fig. 7). Todo lo anterior se relacionó con la actividad locomotora y el tiempo de los movimientos disminuidos en el ratón transgénico respecto a su control.

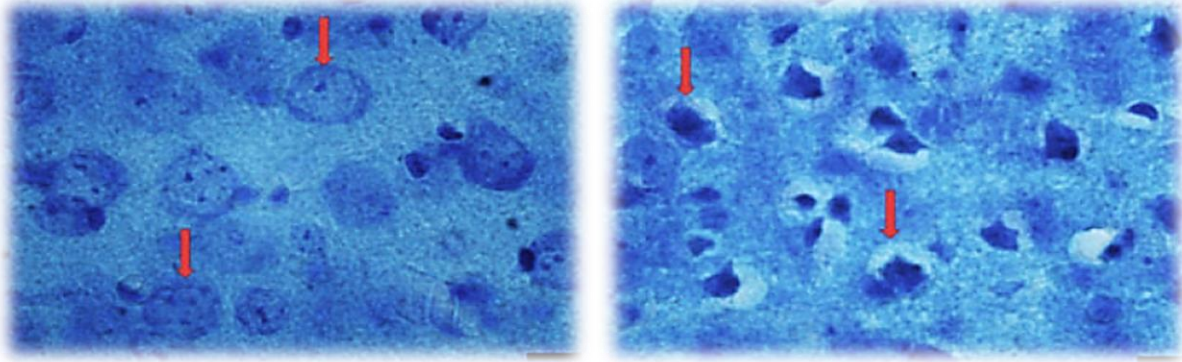


Figura 7. Comparación de neuronas de la M1 con características morfológicas normales de un ratón no transgénico (izquierda) y neuronas de la M1 con características de daño del modelo 3xTg-AD para la EA (derecha) (Tomado de Orta-Salazar et al., 2017)

2.6 Control motor

Los circuitos neuronales responsables del control motor están organizados en niveles, cada uno encargado de distintos aspectos del movimiento (García-Porrero & Hurlé, 2015; Hooks, 2017, Fig. 8). El primer nivel lo constituyen las neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal, las cuales son la única vía por la que los impulsos provenientes del sistema nervioso central pueden llegar a los músculos del aparato locomotor y provocar su contracción. Toda respuesta, sea refleja o voluntaria, se canaliza en última instancia a través de ellas y es por ello que fueron denominadas como la “vía final común” por Charles Scott Sherrington. Este nivel está sujeto a la influencia de neuronas procedentes de los otros 2 niveles. El segundo nivel está formado por grupos de neuronas pertenecientes al núcleo rojo, el colículo superior, los núcleos vestibulares y a la formación reticular, todos ellos ubicados en el tronco del encéfalo. Estos centros de control integran información sensorial proveniente de los sistemas aferentes sensoriales, regulan la actividad de la vía final común y también están sujetos a la regulación del último nivel. El tercer nivel incluye a las neuronas de la corteza cerebral que envían impulsos nerviosos a las neuronas motoras del primer nivel ya sea directamente a través de la vía piramidal o indirectamente mediante los centros de control del tronco encefálico. Este nivel abarca tanto a la corteza motora primaria (M1, responsable de la ejecución actual del movimiento) como a áreas motoras programadoras entre las que están las cortezas somatosensorial primaria y secundaria (S1 y S2, respectivamente, responsables de la realización adecuada del movimiento)

(García-Porrero & Hurlé, 2015; Hooks, 2017). Sumado a estos tres niveles, existen sistemas de regulación del movimiento como el cerebelo, los ganglios basales y el tálamo que actúan a nivel del segundo y tercer nivel y están relacionados con otros aspectos del movimiento (García-Porrero & Hurlé, 2015)

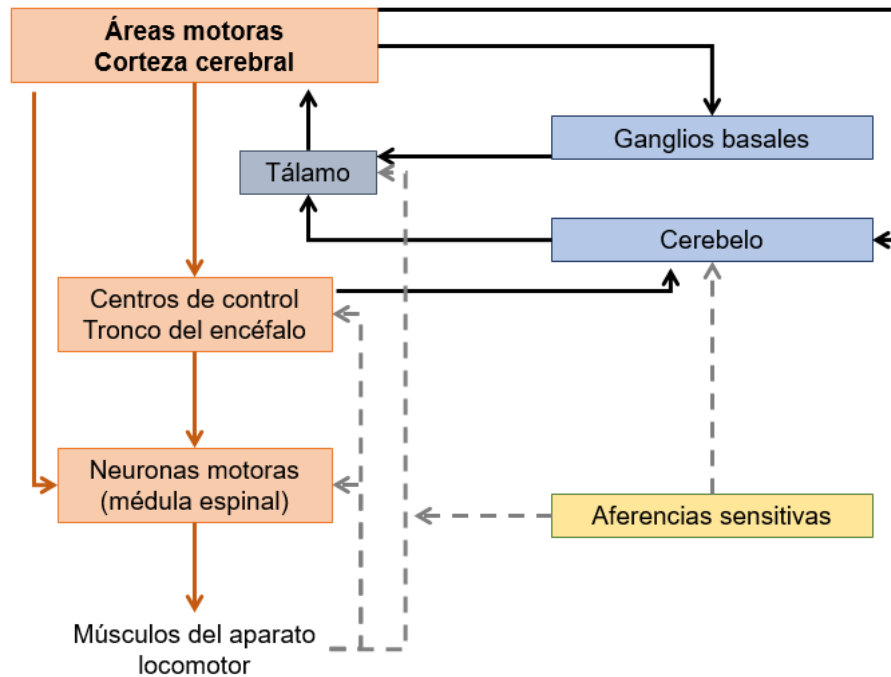


Figura 8. El control motor surge de la interacción bilateral entre diferentes estructuras cerebrales organizadas en niveles e incluyendo áreas reguladoras (Modificado de García-Porrero & Hurlé, 2015)

2.7 Corteza Sensoriomotora

El control motor en los mamíferos requiere que los sistemas motores y sensoriales intercambien e integren información para planear y generar movimientos precisos, de ahí que la conjunción de ambos sistemas en la corteza se conozca como la corteza sensoriomotora (SM) (Young et al., 2012; Moreno-López et al., 2016; Hooks, 2017). Ambas pueden ser diferenciadas entre sí mediante su localización en las cortezas frontal y parietal, su citoarquitectura y su patrón de conexiones con otras estructuras cerebrales (Young et al., 2012; Hooks, 2017). La corteza SM, al formar parte de la isocorteza, presenta una estructura en forma de estratos o capas, cada una con sus características particulares y numeradas desde la piamadre hasta la sustancia blanca (Kandel, 2001; Kirkcaldie, 2012; Fig. 9). En la primera capa (I), o *estrato molecular*, se

localizan los axones que recorren la superficie cortical y las dendritas de neuronas piramidales cuyos somas se posicionan en las capas más profundas (Douglas & Martin, 2004). La capa II, o *estrato granuloso externo*, contiene pequeñas células esféricas o “gránulos”, término del que proviene el nombre de dicha capa (Kandel, 2001). La capa III, o *estrato piramidal externo*, posee neuronas piramidales pequeñas e interneuronas como las células en cesto y las células en candelabro (Kandel, 2001; Kirkcaldie, 2012). La capa IV, o *estrato granuloso interno*, también está formada por gránulos, mostrando esa similitud con la capa II (Kandel, 2001). En la capa V, o *estrato piramidal interno*, se encuentran neuronas piramidales más grandes que las ubicadas en la capa III y cuyas proyecciones inervan tanto a regiones corticales (otras capas) como a estructuras subcorticales (cuerpo estriado y médula espinal, entre otras) (Kandel, 2001; Kirkcaldie, 2012). La capa VI, o *estrato multiforme*, tiene neuronas de morfologías variadas (fusiformes) y orientación horizontal (Kirkcaldie, 2012).

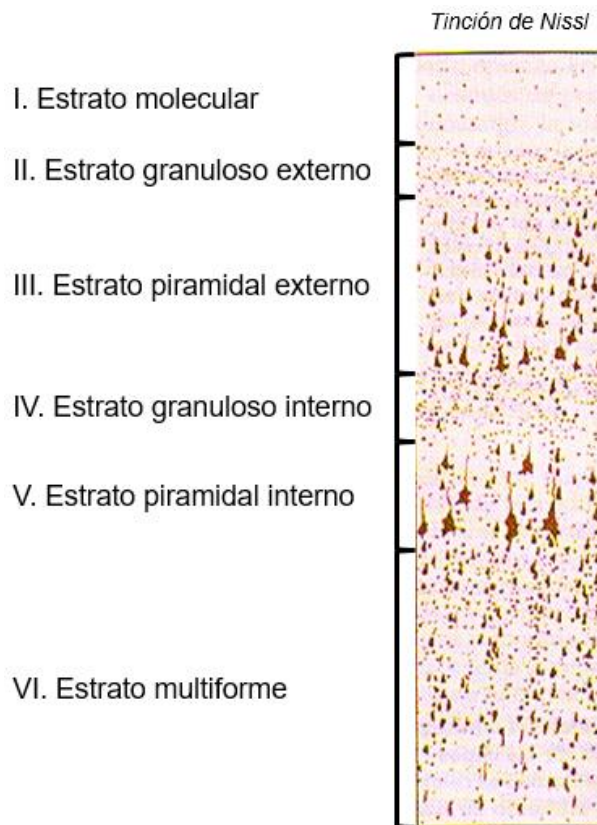


Figura 9. Las capas de la corteza SM tienen diferentes tipos celulares y puede tanto enviar como recibir inervaciones de estructuras subcorticales y de otras cortezas (Modificado de Kandel, 2001).

La corteza SM controla la ejecución del movimiento a través de las neuronas de proyección que residen en la capa V y que tienen inervaciones hacia estructuras subcorticales como la proyección de las neuronas corticoespinales (CSp) para el control motor (Oswald et al., 2013; Olivares-Moreno et al., 2017; Welniarz et al., 2017). Los axones de estas neuronas forman el tracto CSp que actúa de manera directa sobre las motoneuronas del asta ventral (que dirigen la actividad muscular) o indirectamente sobre las motoneuronas mediante las interneuronas premotoras (Porter & Lemon, 1993; Lemon, 2008; Fig. 10).

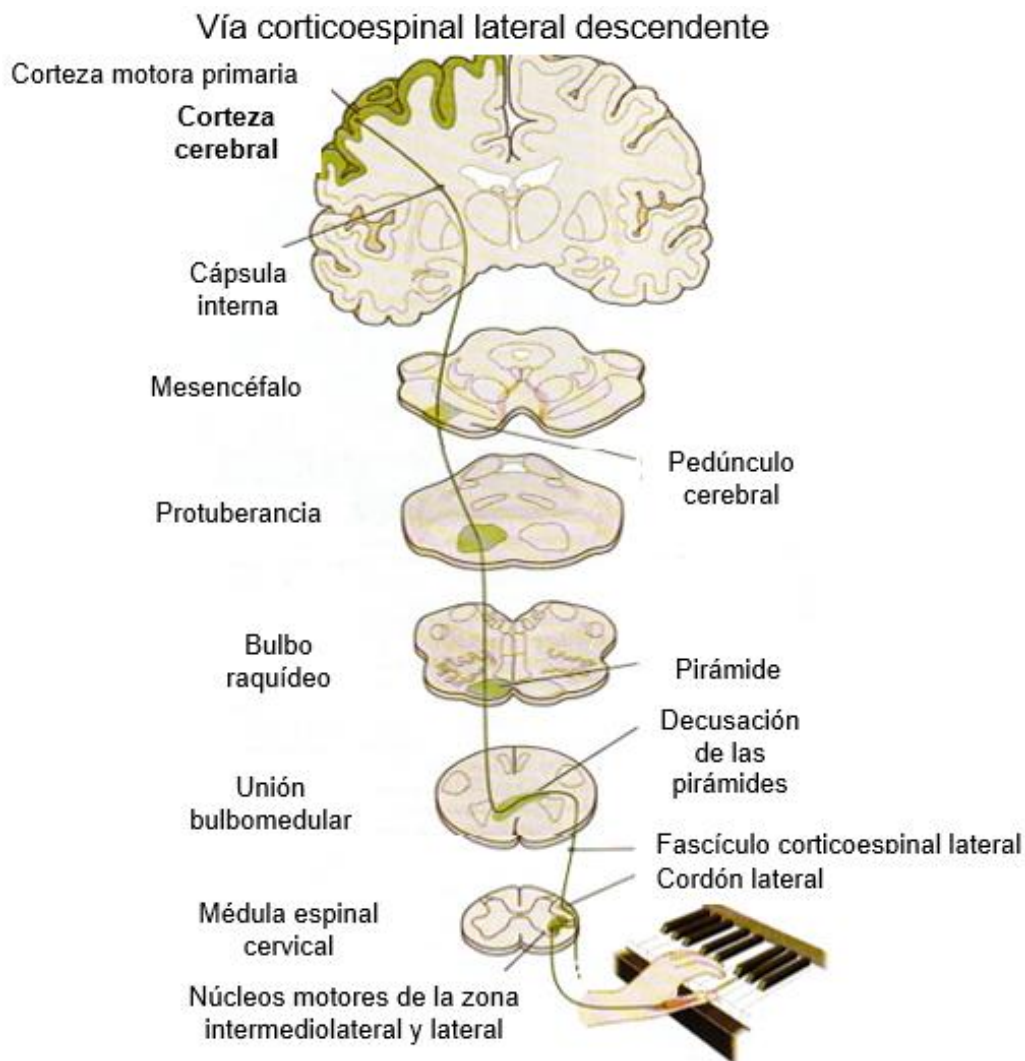


Figura 10. El tracto corticoespinal lateral se origina de las neuronas piramidales que residen en la capa V de la corteza cerebral y decusa a nivel de la unión bulbomedular, continuando su trayecto en la médula espinal para inervar tanto motoneuronas como interneuronas (Modificado de Tortora, 2002)

3. Justificación

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento de tipo neurodegenerativo que afecta a millones de personas en el mundo y se sabe que la incidencia aumentará de manera exponencial en los siguientes años debido al aumento en la esperanza de vida de la población. De manera importante, durante el curso de la enfermedad, además del deterioro de las funciones cognitivas, también se han reportado alteraciones motoras y, dado que el control motor es comandado por las neuronas de proyección corticoespinal (CSp) que inervan a la médula espinal y que residen en la capa V de la corteza sensoriomotora (SM), es importante caracterizar de manera morfométrica estas neuronas de proyección en un modelo transgénico de la EA (3xTg-AD), lo cual podría permitir entender mejor el mecanismo por el que se origina este declive en la función motora durante la patología. Lo anterior podría proponer el desarrollo de blancos terapéuticos durante los periodos críticos de la EA.

4. Hipótesis

Si las neuronas de proyección corticoespinales residentes en la capa V de la corteza sensoriomotora se encuentran dañadas, entonces observaremos alteraciones en la actividad locomotora espontánea en el modelo transgénico 3xTg-AD.

5. Objetivos

5.1 General

Caracterizar el estado morfométrico de las neuronas de proyección CSp de la capa V de la SM en una etapa (10-11 meses) del progreso de la patología tipo Alzheimer, relacionado con la actividad locomotora espontánea en el modelo 3xTg-AD.

5.2 Particulares

- Evaluar la actividad locomotora espontánea mediante la prueba conductual de campo abierto en ratones transgénicos 3xTg-AD, machos y hembras de 10-11 meses de edad.
- Analizar el estado morfométrico de las neuronas CSp de la SM por medio de la tinción de Nissl fluorescente y el trazador retrógrado Fluorogold en ratones triple transgénicos 3xTg-AD, machos y hembras de 10-11 meses de edad.

6. Sujetos, Material y Métodos

6.1 Animales

Todos los procedimientos se realizaron bajo las normas del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones 3xTg-AD y no transgénicos (No-Tg) machos y hembras tuvieron acceso *ad libitum* al agua y alimento y fueron mantenidos en condiciones de *vivarium*. Las edades de los ratones se ubicaron dentro de un rango de edades 10-11 meses (n = 8 para 3xTg-AD hembras, n = 8 para No-Tg hembras, n = 8 para 3xTg-AD machos, n = 8 para No-Tg machos). Se eligió este rango de edad dado que, en equivalencia humana, representan a adultos de mediana edad (de 38 a 47 años de edad), etapa en la que puede tener comienzo el desarrollo de la EA (Flurkey et al., 2007; Kozlov et al., 2017)

6.2 Estudio conductual

El campo abierto es una prueba motora que es utilizada para determinar el nivel de actividad locomotora espontánea y los hábitos de exploración en modelos de ratones (Brooks y Dunnett, 2009). Todos los animales fueron sometidos a la prueba; cada ratón se colocó en una arena cuadrangular (con medidas de 42 cm de largo x 42 cm de ancho x 31 cm de altura) durante 30 minutos con el experimentador fuera de su punto de vista y el movimiento fue capturado con sensores infrarrojos montados tanto a los lados como por debajo de la arena (Omnitech Electronics, Inc.). Los datos con el seguimiento de la trayectoria de cada animal fueron colectados y transmitidos al ordenador utilizando el programa informático Fusion v5.5 SuperFlex Edition (Omnitech

Electronics, Inc.) para ser analizados fuera de línea. Se consideraron como medida de la actividad locomotora la distancia total recorrida, el tiempo en reposo, el número de episodios de reposo, el número de episodios verticales, el tiempo de movimiento vertical, la velocidad promedio y la velocidad máxima.

6.3 Inyección del trazador retrógrado

Los ratones (n = 3 por cada grupo) fueron inyectados con el trazador retrógrado Fluoro-Gold (Fluorochrome) en el asta dorsal de los segmentos cervicales C4-C5 de la médula espinal (coordinadas respecto a la arteria espinal posterior; Medio-Lateral (ML): 500µm; Postero-Anterior (PA): 300µm. Para realizar inyecciones precisas de los trazadores, se acoplaron micropipetas de vidrio graduado (BLAUBRAND® intraMARK) con un diámetro de punta entre 10-25 µm acopladas a una picobomba neumática (PV830, WPI). Antes de cada inyección, se midió el diámetro de la punta de la micropipeta y se calibró la presión y duración del pulso para ajustar la cantidad inyectada (Olivares-Moreno et al., 2017). La incisión se cerró con suturas absorbibles. Cinco días después de las inyecciones se procedió con la fijación y procesamiento histológico.

6.4 Fijación y procesamiento histológico

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (15 mg/kg de peso corporal) para ser perfundidos intracardiamente con paraformaldehído al 4 %. Los cerebros se retiraron del cráneo y se fijaron por inmersión con paraformaldehído al 4 % por 48 horas a temperatura ambiente; los hemisferios fueron separados, colocados en sacarosa al 30 % por una semana y cortados sagitalmente a 50 µm de espesor en un criostato (Leica Biosystems CM1510). Para ser procesados con la técnica de Nissl fluorescente con tejidos flotantes, se utilizó el protocolo estándar para el Neurotrace 530/615 Red Fluorescent Nissl (Thermo Fisher Scientific, 1:100). Dicha técnica se realizó para el análisis morfométrico de neuronas CSp en la capa V de la SM (coordinadas respecto a la línea media; ML: 1.08 - 2.28 mm; Franklin & Paxinos, 2008). Las medidas morfométricas consideradas fueron los diámetros del soma, del núcleo y del nucléolo.

6.5 Adquisición de imágenes y análisis morfométrico de neuronas CSp

Se utilizó un microscopio confocal (Zeiss LSM 780 DUO) acoplado a una cámara digital (AxioCam MRm, 1,3 MP) para capturar imágenes en profundidad (Z-stack) de las secciones que contenían las células marcadas retrógradamente y utilizando los filtros apropiados (Rhodamina: Nissl fluorescente, DAPI: Fluoro-Gold) con un objetivo de 40x (Zeiss Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27). Los diámetros del soma, núcleo y nucléolo fueron medidos utilizando el programa informático ImageJ 1.52n (National Institutes of Health) y establecidos como el promedio del alto y ancho (Oswald et al., 2013) y considerando como punto característico de un objeto específico (König et al., 1991) al nucléolo de la célula en un plano focal medial a éste.

6.6 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando los programas STATISTICA 7 (StatSoft, Inc.) y GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc.) para la obtención de gráficos y aplicación de estadística descriptiva y comparativa. Se obtuvieron los estadísticos descriptivos de los datos y se aplicó una prueba de bondad de ajuste de Shapiro-Wilk.

Para los datos de morfometría con una distribución paramétrica, se realizó una prueba de correlación r de Pearson para saber si existe una relación entre las variables medidas; para los datos con una distribución no paramétrica, se realizó una prueba de correlación r de Spearman.

Para el caso de los datos de con una distribución paramétrica, se procedió a realizar una prueba T de Student entre muestras independientes para comparar diferentes parámetros de locomoción y morfometría entre grupos experimentales o entre sexos.

Para los datos con una distribución no paramétrica, se procedió con una prueba U de Mann Whitney entre muestras independientes. Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar para cada grupo y una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

7. Resultados

7.1 Estudio conductual entre condiciones

Para evaluar la actividad locomotora espontánea, se sometió a ratones 3xTg-AD (machos y hembras con edades de 10-11 meses) y ratones No-Tg (machos y hembras con edades de 10-11 meses) a la prueba de campo abierto (Tabla 1).

Ambos grupos de hembras 10-11 meses mostraron diferencias significativas entre ellos en diferentes parámetros (Tabla 1): distancia total recorrida de 2919.00 ± 549.20 cm para los ratones No-Tg y de 5814.00 ± 694.40 cm para los ratones 3xTg-AD (Fig. 11A, $p = 0.007$, U de Mann-Whitney), tiempo en reposo de 531.00 ± 156.40 s para los ratones No-Tg y de 253.90 ± 148.30 s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 11B, $p = 0.104$, U de Mann-Whitney), número de episodios de reposo de 191.00 ± 58.50 para los ratones No-Tg y de 62.00 ± 38.33 para los ratones 3xTg-AD (Fig. 11C, $p = 0.122$, U de Mann-Whitney), número de episodios verticales de 49.25 ± 11.20 para los ratones No-Tg y de 51.63 ± 11.90 para los ratones 3xTg-AD (Fig. 11D, $p = 0.563$, U de Mann-Whitney), tiempo de movimiento vertical de 109.60 ± 51.99 s para los ratones No-Tg y de 531.90 ± 184.00 s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 11E, $p = 0.037$, U de Mann-Whitney), velocidad promedio de 7.77 ± 0.81 cm/s para los ratones No-Tg y de 11.23 ± 1.13 cm/s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 11F, $p = 0.028$, U de Mann-Whitney) y velocidad máxima de 23.08 ± 2.49 cm/s para los ratones No-Tg y de 40.91 ± 16.31 cm/s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 11G, $p = 0.505$, U de Mann-Whitney).

Por otro lado, los machos 3xTg-AD de 10-11 meses mostraron diferencias significativas cuando se compararon con el grupo No-Tg (Tabla 1): distancia total recorrida de 6376.00 ± 579.00 cm para los ratones No-Tg y de 3580.00 ± 447.50 cm para los ratones 3xTg-AD (Fig. 12A, $p = 0.001$, T de Student), tiempo en reposo de 528.20 ± 44.43 s para los ratones No-Tg y de 746.40 ± 29.93 s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 12B, $p = 0.003$, U de Mann-Whitney), número de episodios de reposo de 270.80 ± 14.16 para los ratones No-Tg y de 322.90 ± 9.97 para los ratones 3xTg-AD (Fig. 12C, $p = 0.009$, T de Student), número de episodios verticales de 203.50 ± 25.75 para los ratones No-Tg y de 144.50 ± 19.47 para los ratones 3xTg-AD (Fig. 12D, $p = 0.037$, U de Mann-Whitney), tiempo de movimiento vertical de 430.30 ± 200.00 s para los ratones No-Tg y de 204.30

± 144.60 s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 12E, $p = 0.007$, U de Mann-Whitney), velocidad promedio de 13.45 ± 0.99 cm/s para los ratones No-Tg y de 12.78 ± 1.67 cm/s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 12F, $p = 0.734$, T de Student) y velocidad máxima de 37.29 ± 3.63 cm/s para los ratones No-Tg y de 33.75 ± 2.95 cm/s para los ratones 3xTg-AD (Fig. 12G, $p = 0.461$, T de Student).

	Distancia total recorrida (cm)	Tiempo en reposo (s)	Número de episodios de reposo	Número de episodios verticales	Tiempo en movimiento vertical (s)	Velocidad promedio (cm/s)	Velocidad máxima (cm/s)
No-Tg hembras	2919.00	531.00	191.00	49.25	109.60	7.77	23.08
	\pm 549.2	\pm 156.40	\pm 58.50	\pm 11.20	\pm 51.99	\pm 0.81	\pm 2.49
No-Tg machos	6376.00	528.20	270.8	203.5	430.30	13.45	37.29
	\pm 579.00	\pm 44.43	\pm 14.16	\pm 25.75	\pm 200.00	\pm 0.99	\pm 3.63
3xTg-AD hembras	5814.00	253.90	62.00	51.63	531.90	11.23	40.91
	\pm 694.40	\pm 148.30	\pm 38.33	\pm 11.90	\pm 184.00	\pm 1.13	\pm 16.31
3xTg-AD machos	3580.00	746.4	322.9	144.5	204.30	12.78	33.75
	\pm 447.5	\pm 29.93	\pm 9.97	\pm 19.47	\pm 144.60	\pm 1.67	\pm 2.95
Estadística	A, B, C, D	C, D	C, D	A, C, D	A, B, C	A, B	A

Tabla 1. Características conductuales de los grupos experimentales sometidos a la prueba de campo abierto. Prueba T de Student para datos con distribución paramétrica y prueba U de Mann-Whitney para datos con distribución no paramétrica. Media \pm Error Estándar. **A** = No-Tg hembras vs No-Tg machos, **B** = No-Tg hembras vs 3xTg-AD hembras, **C** = No-Tg Machos vs 3xTg-AD Machos, **D** = 3xTg-AD hembras vs 3xTg-AD machos.

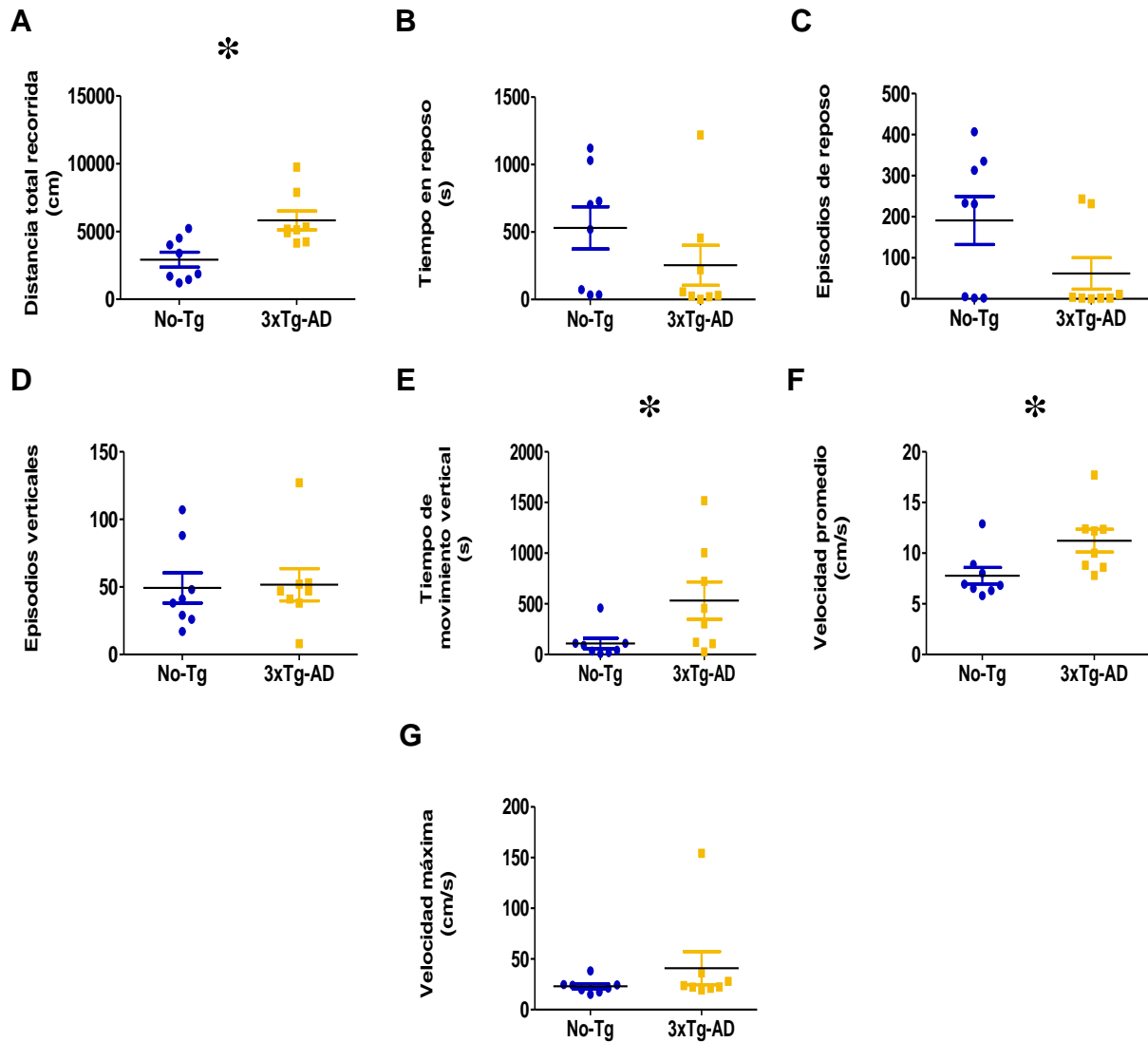


Figura 11. Características conductuales de los ratones hembras No-Tg y 3xTg-AD de 10-11 meses sometidos a la prueba de campo abierto. Distancia total recorrida (A), tiempo en reposo (B), número de episodios de reposo (C), número de episodios verticales (D), tiempo de movimiento vertical (E), velocidad promedio (F) y velocidad máxima (G). $n = 8$ para cada uno de los grupos (* = $p < 0.05$, U de Mann-Whitney). Las barras de error representan el error estándar.

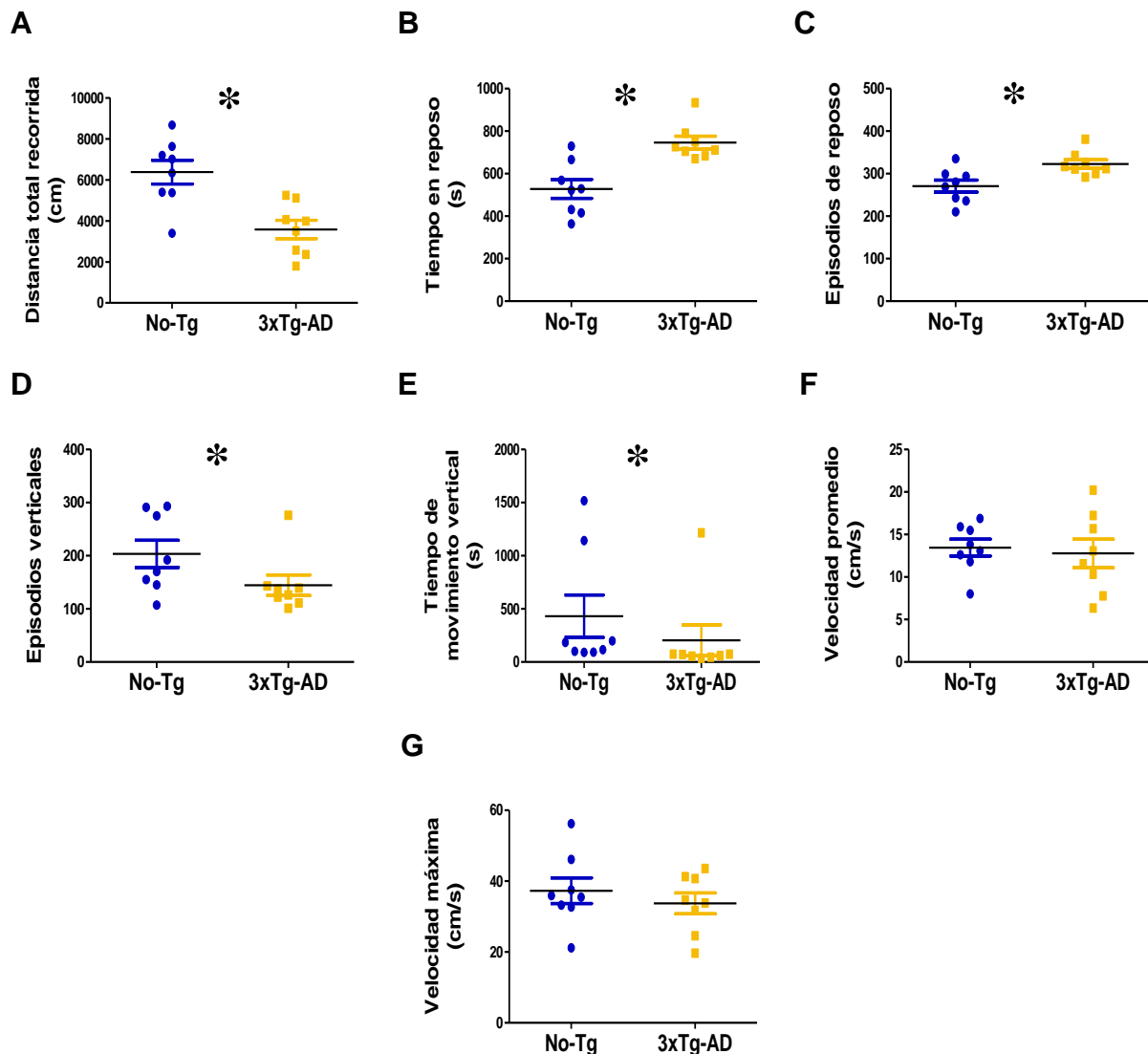


Figura 12. Características conductuales de los ratones machos No-Tg y 3xTg-AD de 10-11 meses sometidos a la prueba de campo abierto. Distancia total recorrida (A), tiempo en reposo (B), número de episodios de reposo (C), número de episodios verticales (D), tiempo de movimiento vertical (E), velocidad promedio (F) y velocidad máxima (G). $n = 8$ para cada uno de los grupos (* = $p < 0.05$, T de Student en A, C, F y G, U de Mann-Whitney en B, D y E). Las barras de error representan el error estándar.

7.2 Estudio conductual entre sexos

Ambos grupos de ratones No-Tg de 10-11 meses mostraron diferencias significativas entre ellos en diferentes parámetros (Tabla 1): distancia total recorrida de 2919.00 ± 549.2 cm para los ratones hembras y de 6376.00 ± 579.0 cm para los ratones machos (Fig. 13A, $p = 0.000$, T de Student), tiempo en reposo de 531.00 ± 156.40 s para los ratones hembras y de 528.90 ± 44.43 s para los ratones machos (Fig. 13B, $p = 0.986$, T de Student), número de episodios de reposo de 191.00 ± 58.50 para los ratones

hembras y de 270.80 ± 14.16 para los ratones machos (Fig. 13C, $p = 0.206$, T de Student), número de episodios verticales de 49.25 ± 11.20 para los ratones hembras y de 203.50 ± 25.75 para los ratones machos (Fig. 13D, $p = 0.000$, T de Student), tiempo de movimiento vertical de 109.60 ± 51.99 s para los ratones hembras y de 430.30 ± 200.00 s para los ratones machos (Fig. 13E, $p = 0.045$, U de Mann-Whitney), velocidad promedio de 7.76 ± 0.81 cm/s para los ratones hembras y de 13.45 ± 0.99 cm/s para los ratones machos (Fig. 13F, $p = 0.004$, U de Mann-Whitney) y velocidad máxima de 23.08 ± 2.49 cm/s para los ratones hembras y de 37.29 ± 3.63 cm/s para los ratones machos (Fig. 13G, $p = 0.006$, T de Student).

Por otro lado, los animales 3xTg-AD de 10-11 meses mostraron diferencias significativas cuando se compararon entre sexos (Tabla 1): distancia total recorrida de 5814.00 ± 694.40 cm para los ratones hembras y de 3580.00 ± 447.00 cm para los ratones machos (Fig. 14A, $p = 0.010$, U de Mann-Whitney), tiempo en reposo de 253.90 ± 148.30 s para los ratones hembras y de 746.00 ± 29.90 s para los ratones machos (Fig. 14B, $p = 0.010$, U de Mann-Whitney), número de episodios de reposo de 62.00 ± 38.33 para los ratones hembras y de 323.00 ± 9.97 para los ratones machos (Fig. 14C, $p = 0.000$, U de Mann-Whitney), número de episodios verticales de 51.63 ± 11.90 para los ratones hembras y de 144.50 ± 19.47 para los ratones machos (Fig. 14D, $p = 0.003$, U de Mann-Whitney), tiempo de movimiento vertical de $531.9.90 \pm 184.00$ s para los ratones hembras y de 204.30 ± 144.60 s para los ratones machos (Fig. 14E, $p = 0.065$, U de Mann-Whitney), velocidad promedio de 11.23 ± 1.13 cm/s para los ratones hembras y de 12.76 ± 1.67 cm/s para los ratones machos (Fig. 14F, $p = 0.457$, T de Student) y velocidad máxima de 40.91 ± 16.31 cm/s para los ratones hembras y de 33.75 ± 2.95 cm/s para los ratones machos (Fig. 14G, $p = 0.194$, U de Mann-Whitney).

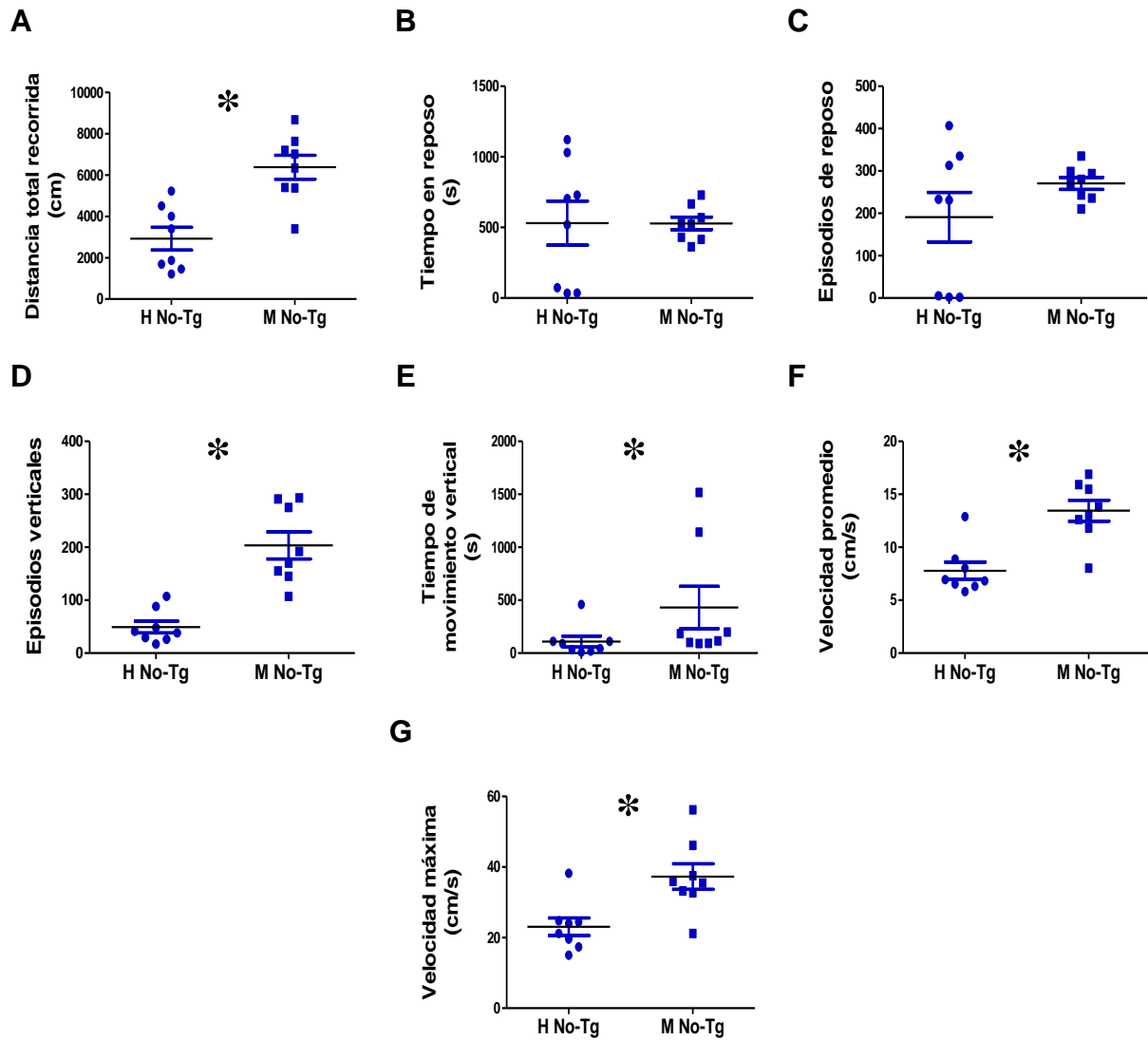


Figura 13. Características conductuales de los ratones hembras y machos No-Tg de 10-11 meses sometidos a la prueba de campo abierto. Distancia total recorrida (**A**), tiempo en reposo (**B**), número de episodios de reposo (**C**), número de episodios verticales (**D**), tiempo de movimiento vertical (**E**), velocidad promedio (**F**) y velocidad máxima (**G**). $n = 8$ para cada uno de los grupos (* = $p < 0.05$, T de Student en A, B, C, D, y G, U de Mann-Whitney en E y F). Las barras de error representan el error estándar.

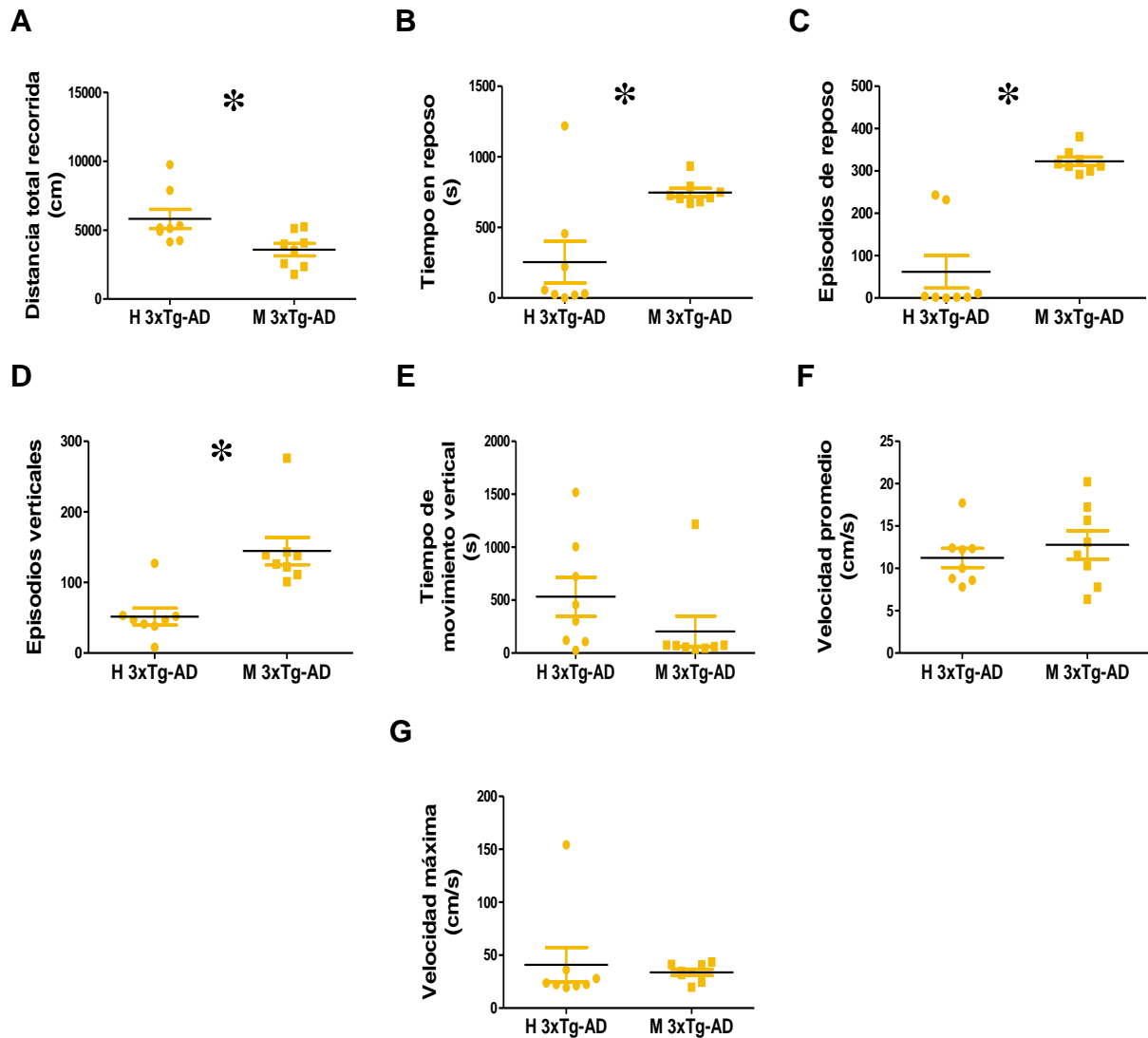


Figura 14. Características conductuales de los ratones hembras y machos 3xTg-AD de 10-11 meses sometidos a la prueba de campo abierto. Distancia total recorrida (**A**), tiempo en reposo (**B**), número de episodios de reposo (**C**), número de episodios verticales (**D**), tiempo de movimiento vertical (**E**), velocidad promedio (**F**) y velocidad máxima (**G**). $n = 8$ para cada uno de los grupos meses (* = $p < 0.05$, T de Student en F, U de Mann Whitney en A, B, C, D, E y G). Las barras de error representan el error estándar.

7.3 Marcaje fluorescente de neuronas CSp

Para diferenciar a las neuronas CSp de otros tipos celulares residentes en la capa V de la corteza SM, a ratones 3xTg-AD (machos y hembras, edades de 10-11 meses, $n = 3$ de cada grupo) y ratones No-Tg (machos y hembras, edades de 10-11 meses, $n = 3$ de cada grupo) les fue inyectado el trazador retrógrado llamado Fluoro-Gold en el asta dorsal de los segmentos cervicales C4-C5 de la médula espinal (Fig. 15).

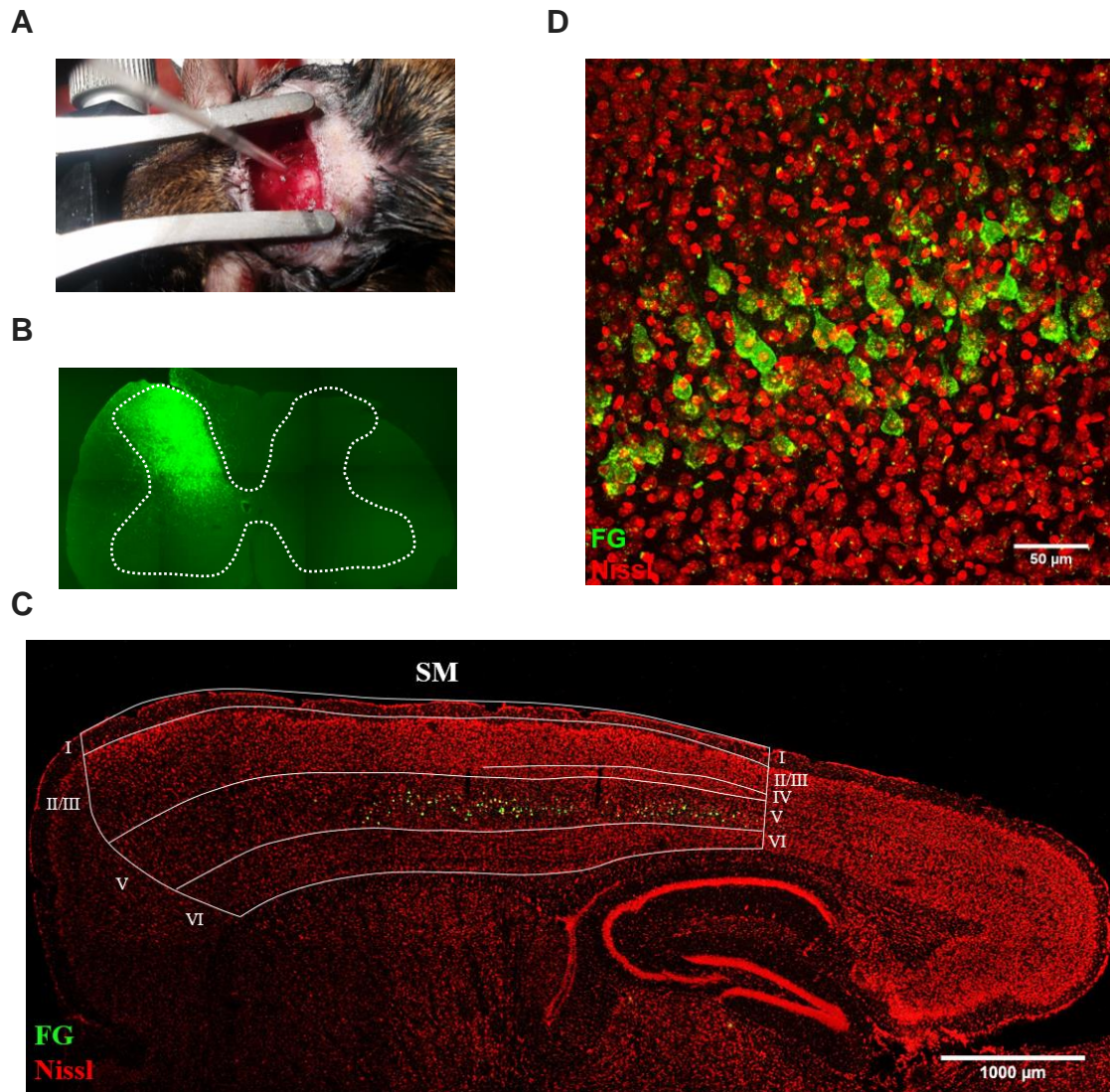


Figura 15. Marcaje de las neuronas corticoespinales en la corteza sensoriomotora. Inyección de Fluoro-Gold en la asta dorsal de los segmentos cervicales C4-C5 de la médula espinal (A). Corroboración del sitio de inyección (B). Microfotografía en mosaico en un corte sagital de 50 µm de grosor de la SM contralateral al sitio de inyección (C). Acercamiento de la capa V donde se observa la colocalización de la marca del trazador (en verde) y de Nissl fluorescente (en rojo) (D).

7.4 Diámetros del soma, núcleo y nucléolo de las neuronas CSp entre condiciones

Para saber si había diferencias morfométricas entre las neuronas CSp de ratones No-Tg y 3xTg-AD, se midió el diámetro del soma, núcleo y nucléolo de dichas células (machos y hembras, n = 3 de cada grupo, 60 células de cada individuo; Tabla 2).

Las hembras No-Tg de 10-11 meses presentaron un diámetro promedio de 16.35 ± 0.13 µm del soma, 9.73 ± 0.10 µm del núcleo y 3.71 ± 0.03 µm del nucléolo (Tabla 2), habiendo una correlación lineal positiva entre cada una de las variables (Fig. 16A, r de

Pearson = 0.731, $p = 0.000$ para la relación soma-núcleo; Fig. 16B, r de Pearson = 0.392, $p = 0.000$ para la relación soma-nucléolo; Fig. 16C, r de Pearson = 0.231, $p = 0.001$ para la relación núcleo-nucléolo). Por su parte, las hembras 3xTg-AD mostraron un diámetro promedio de $15.90 \pm 0.14 \mu\text{m}$ del soma, $9.33 \pm 0.10 \mu\text{m}$ del núcleo y $3.60 \pm 0.02 \mu\text{m}$ del nucléolo, habiendo una correlación lineal positiva entre cada una de las variables (Fig. 16D, r de Pearson = 0.779, $p = 0.000$ para la relación soma-núcleo; Fig. 16E, r de Spearman = 0.331, $p = 0.000$ para la relación soma-nucléolo; Fig. 16F, r de Spearman = 0.203, $p = 0.006$ para la relación núcleo-nucléolo).

	Diámetro del soma (μm)	Diámetro del núcleo (μm)	Diámetro del nucléolo (μm)
No-Tg hembras	16.35 ± 0.13	9.73 ± 0.10	3.71 ± 0.03
No-Tg machos	16.29 ± 0.18	9.75 ± 0.11	3.55 ± 0.03
3xTg-AD hembras	15.90 ± 0.14	9.33 ± 0.10	3.60 ± 0.02
3xTg-AD machos	17.40 ± 0.15	10.72 ± 0.12	3.45 ± 0.03
Estadística	<i>B, C, D</i>	<i>B, C, D</i>	<i>A, B, C, D</i>

Tabla 2. Características morfométricas de las neuronas CSp de los grupos experimentales. Prueba de T de Student para datos con distribución paramétrica y prueba U de Mann-Whitney para datos con distribución no paramétrica. Media \pm Error Estándar. **A** = No-Tg hembras vs No-Tg machos, **B** = No-Tg hembras vs 3xTg-AD hembras, **C** = No-Tg Machos vs 3xTg-AD Machos, **D** = 3xTg-AD hembras vs 3xTg-AD machos.

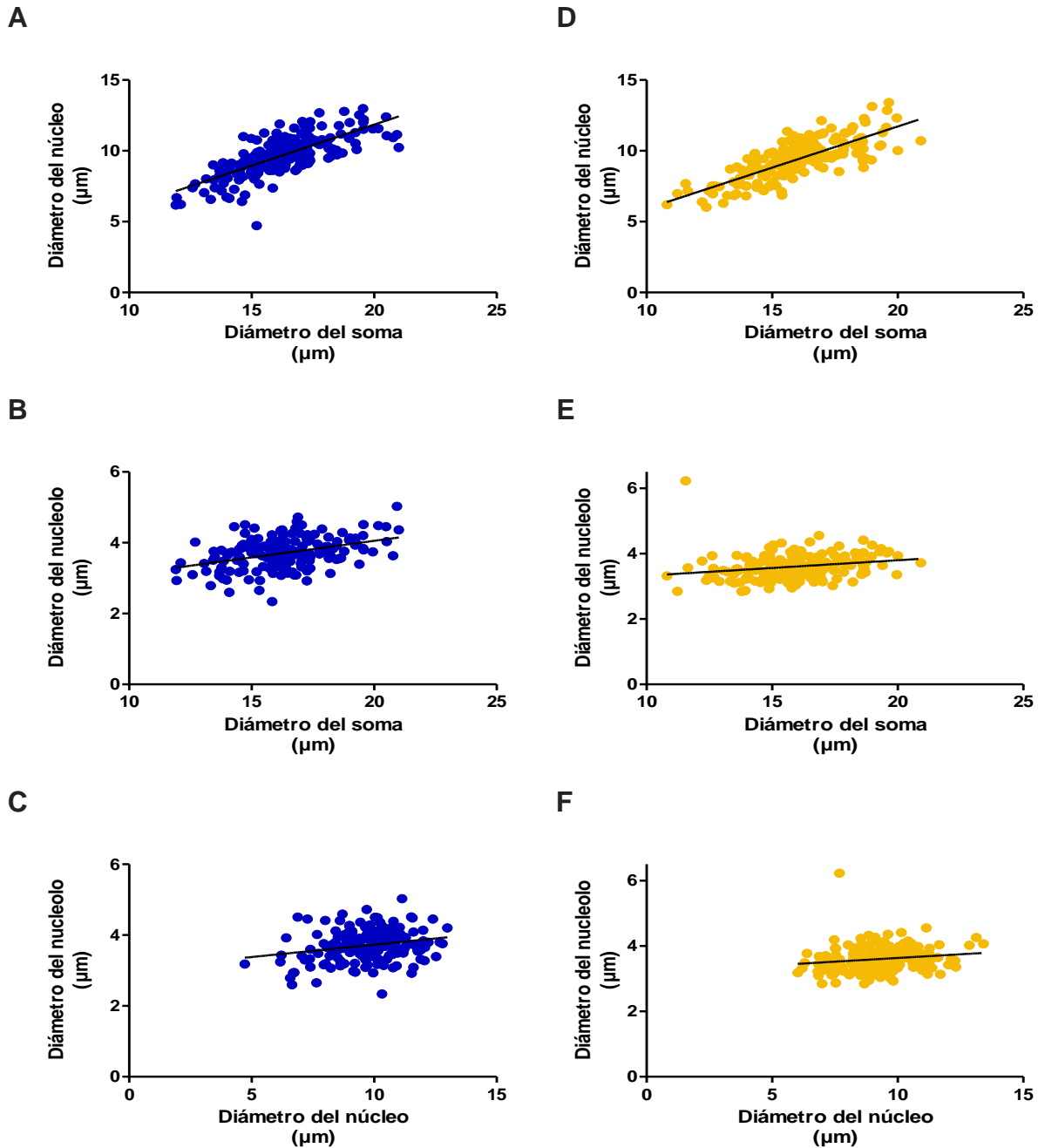


Figura 16. Correlaciones entre los diámetros de soma, núcleo y nucleolo de hembras No-Tg (Izquierda, Azul) y 3xTg-AD (Derecha, Amarillo). Relación Soma-Núcleo (A,D), Soma-Nucleolo (B,E) y Núcleo-Nucleolo (C,F). $n = 3$, 60 células CSp de cada individuo para cada uno de los grupos ($p < 0.05$, r de Pearson en A-D, r de Spearman en E-F).

Al comparar los diámetros entre hembras de ambos grupos, se encontró que las hembras 3xTg-AD presentan una disminución en el diámetro de las tres estructuras medidas cuando se compararon con las hembras No-Tg (Fig. 17A, para el soma, $p =$

0.025, T de Student; Fig. 17B, para el núcleo, $p = 0.010$, T de Student; Fig. 17C, para el nucléolo, $p = 0.003$, U de Mann-Whitney).

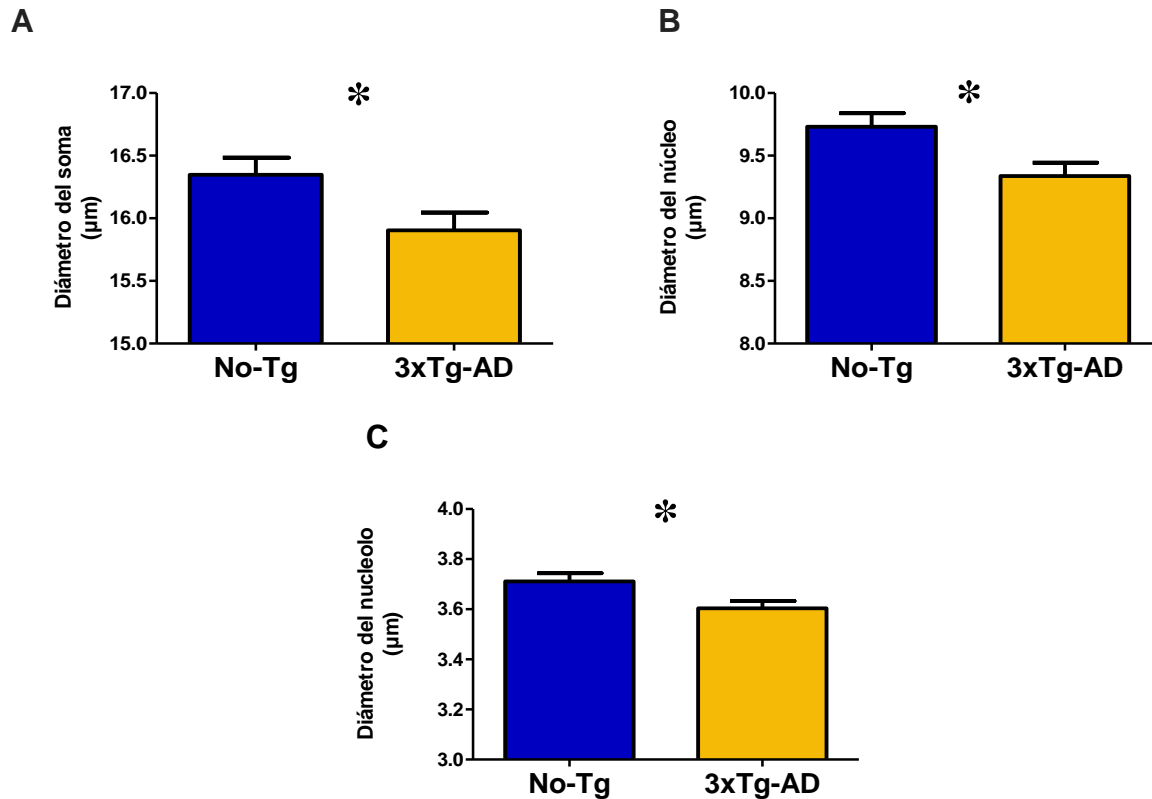


Figura 17. Características morfométricas de las neuronas CSp de las hembras No-Tg (en azul) y 3xTg-AD (en amarillo) de 10-11 meses. Diámetro del soma (A), diámetro del núcleo (B) y diámetro del nucléolo (C). $n = 3$, 60 células CSp de cada individuo para cada uno de los grupos (* = $p < 0.05$, T de Student en A y B, U de Mann-Whitney en C). Las barras de error representan el error estándar.

Los machos No-Tg de 10-11 meses presentaron un diámetro promedio de $16.29 \pm 0.18 \mu\text{m}$ del soma, $9.75 \pm 0.11 \mu\text{m}$ del núcleo y $3.55 \pm 0.03 \mu\text{m}$ del nucléolo (Tabla 2), habiendo una correlación lineal positiva para la relación soma-núcleo (Fig. 18A, r de Spearman = 0.817, $p = 0.000$ para la relación soma-núcleo; Fig. 18B, r de Spearman = 0.505, $p = 0.000$ para la relación soma-nuécleolo; Fig. 18C, r de Pearson = 0.429, $p = 0.000$ para la relación núcleo-nuécleolo). Los machos 3xTg-AD mostraron un diámetro promedio de $17.40 \pm 0.15 \mu\text{m}$ del soma, $10.72 \pm 0.12 \mu\text{m}$ del núcleo y $3.45 \pm 0.03 \mu\text{m}$ del nucléolo, habiendo una correlación lineal positiva para la relación soma-núcleo (Fig. 18D, r de Pearson = 0.710, $p = 0.000$), no correlación en la relación soma-nuécleolo (Fig.

18E, r de Spearman = 0.137, p = 0.066) y una correlación lineal negativa para la relación núcleo-nucléolo (Fig. 18F, r de Spearman = -0.162, p = 0.029).

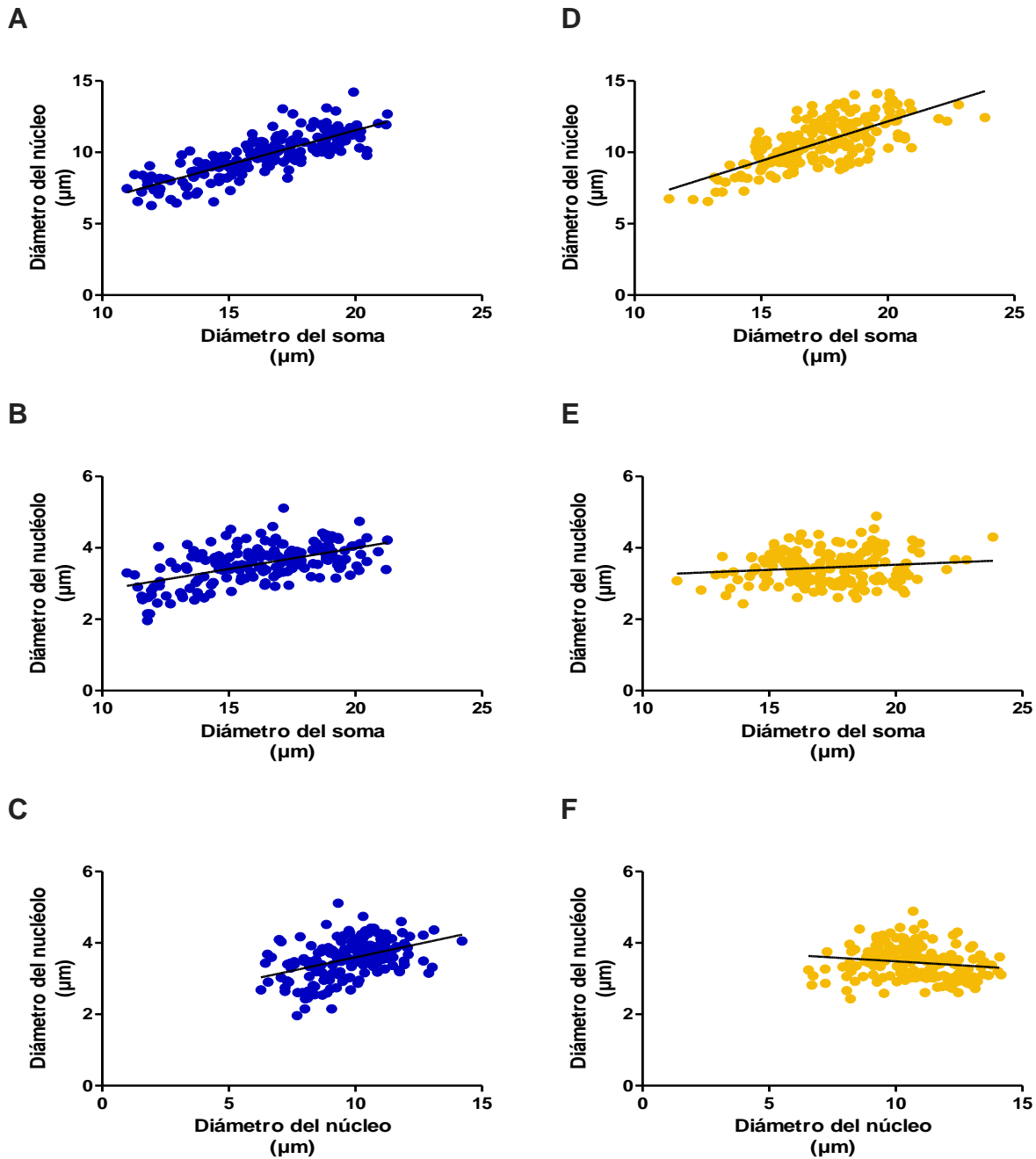


Figura 18. Correlaciones entre los diámetros de soma, núcleo y nucléolo de machos No-Tg (Izquierda, Azul) y 3xTg-AD (Derecha, Amarillo). Relación Soma-Núcleo (A,D), Soma-Nucléolo (B,E) y Núcleo-Nucléolo (C,F). n = 3, 60 células CSp de cada individuo para cada uno de los grupos (p < 0.05 en A-D y F, r de Pearson en C-D, r de Spearman en A-B y E-F).

Al comparar los diámetros entre machos de ambos grupos, se encontró que los machos 3xTg-AD presentan una disminución en el diámetro de las tres estructuras medidas cuando se compararon con los machos No-Tg (Fig. 19A, para el soma, $p = 0.000$, U de Mann-Whitney; Fig. 19B, para el núcleo, $p = 0.000$, T de Student; Fig. 19C, para el nucléolo, $p = 0.038$, T de Student).

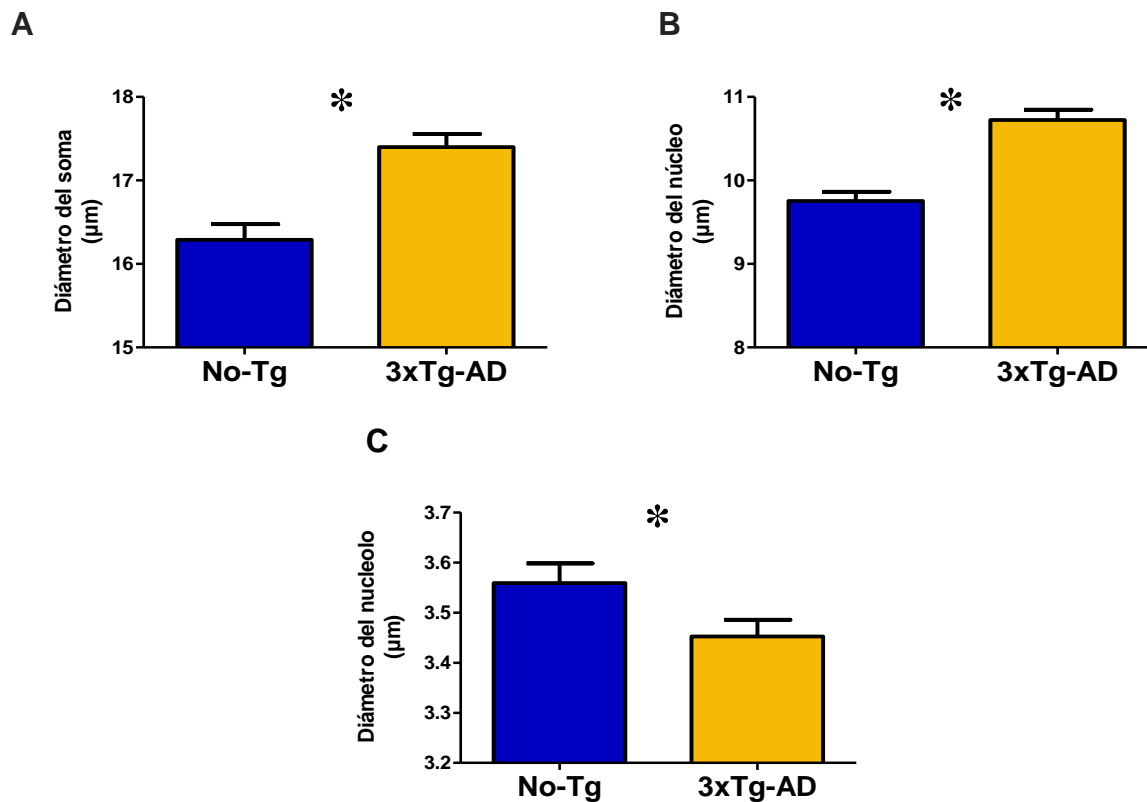


Figura 19. Características morfométricas de las neuronas CSp de los machos No-Tg (en azul) y 3xTg-AD (en amarillo) de 10-11 meses. Diámetro del soma (**A**), diámetro del núcleo (**B**) y diámetro del nucléolo (**C**). $n = 3$, 60 células CSp de cada individuo para cada uno de los grupos (* = $p < 0.05$, T de Student en B y C, U de Mann-Whitney en A). Las barras de error representan el error estándar.

7.5 Diámetros del soma, núcleo y nucléolo de las neuronas CSp entre sexos

Al comparar los diámetros entre sexos de los grupos, se encontró que no hay diferencias entre el tamaño del soma y el núcleo entre machos y hembras No-Tg (Fig. 18A, para el soma, $p = 0.858$, U de Mann-Whitney; Fig. 18B, para el núcleo, $p = 0.884$, T de Student) pero sí en cuanto al tamaño del nucléolo, siendo los machos No-Tg quienes presentan un menor diámetro (Fig. 18C, $p = 0.003$, T de Student). En tanto a los ratones 3xTg-AD, los machos presentan un mayor diámetro del soma y núcleo (Fig.

18D, para el soma, $p = 0.000$, T de Student; Fig. 18E, para el núcleo, $p = 0.000$, T de Student) y un menor diámetro del nucléolo respecto a las hembras (Fig. 18E, $p = 0.000$, U de Mann-Whitney).

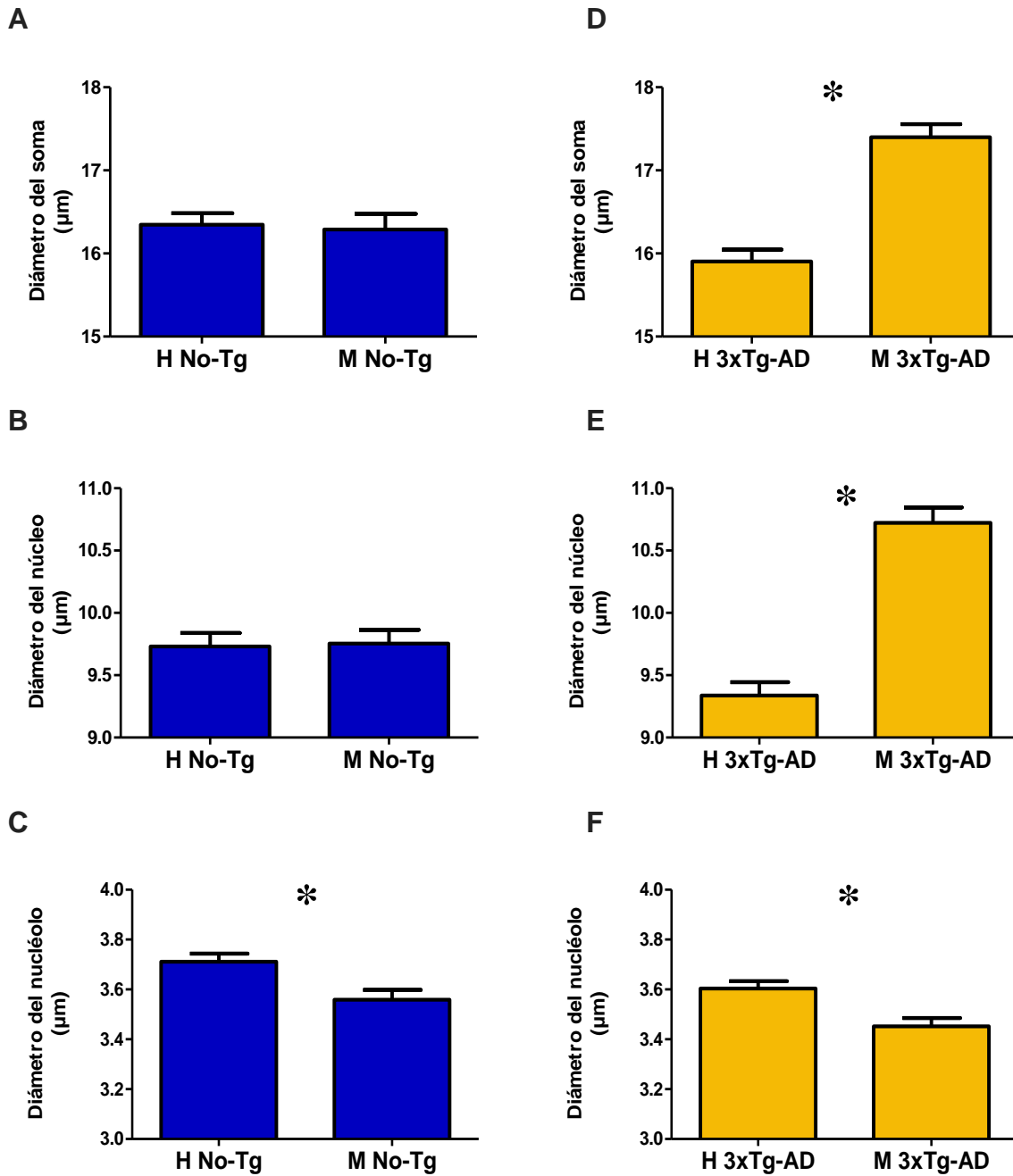


Figura 20. Comparativa de las características morfométricas de las células CSp entre sexos (ratones No-Tg en azul, 3xTg-AD en amarillo). Diámetro del soma (A, D), diámetro del núcleo (B, E) y diámetro del nucléolo (C, F). $n = 3$, 60 células CSp de cada individuo para cada uno de los grupos (* = $p < 0.05$, T de Student en B, C, D y E, U de Mann-Whitney en A y F). Las barras de error representan el error estándar.

8. Discusión

8.1 Análisis conductual entre condiciones

Como se mencionó previamente, la EA es el tipo de demencia más común y está relacionada con el deterioro de las funciones cognitivas, sin embargo, también ha sido relacionada con deficiencias en el ámbito motor tales como una disminución en el nivel de actividad (Pettersson et al., 2002), un menor tamaño de la zancada (Maquet et al., 2010), una reducción en la velocidad de la marcha (Camicoli et al., 1998; Buracchio et al., 2010; Maquet et al., 2010) así como un mayor tiempo y número de pasos en realizar pruebas motoras (Pettersson et al., 2002). Los modelos animales reproducen ciertas características tipo Alzheimer y han sido invaluable para replicar los cambios progresivos en las fases sintomáticas de la patología, por lo que en el presente trabajo se utilizó un ratón transgénico para la EA denominado 3xTg-AD, el cual presenta placas amiloideas y marañas neurofibrilares compuestas por la proteína Tau hiperfosforilada, características dependientes de la edad del animal y de estructuras cerebrales específicas que son vulnerables a la enfermedad (Oddo et al., 2003). Con el fin de evaluar la actividad locomotora espontánea de este modelo, el diseño experimental permitió medir parámetros motores a través de la actividad locomotora espontánea en ambos sexos, encontrando que, para el caso de las hembras 3xTg-AD, recorren más distancia, pasan más tiempo en movimiento vertical y muestran una velocidad promedio mayor respecto a las hembras No-Tg (Fig. 11A, E y F), lo cual indica un mayor nivel de actividad y exploración. Lo anterior puede ser atribuido al efecto neuroprotector de las hormonas sexuales como los estrógenos y la progesterona. Los ratones utilizados en este trabajo tenían edades aproximadas entre 10 y 11 meses, lo que en equivalencia endócrina con los humanos sería la perimenopausia, es decir, el periodo de transición entre la edad reproductiva y la menopausia, etapa en la que aún hay hormonas circulantes en la sangre (Nelson et al., 1981; Mobbs et al., 1984; Diaz-Brinton, 2012). Utilizando hembras C57BL/6J (cepa que es parte del fondo genético del 3xTg-AD) de entre 5.5 - 7.5 y 10 - 12.5 meses de edad, Nelson et al. en 1981 reportaron que, para el caso del estradiol, éste mantiene niveles similares entre ambas edades durante el proestro y estro pero disminuyen en el metaestro y diestro en la edad de 10 - 12.5

meses; en tanto, la progesterona mantiene niveles similares entre ambas edades y en las diferentes etapas del ciclo estral.

Utilizando este mismo modelo transgénico, Carroll et al., 2007 redujeron experimentalmente los estrógenos y la progesterona mediante ovariectomías y reportaron una exacerbada acumulación de β A intraneuronal e hiperfosforilación de Tau, eventos que fueron revertidos de manera significativa cuando las hembras ovariectomizadas fueron tratadas con 17β -estradiol y progesterona, lo cual sugiere que los estrógenos protegen contra el desarrollo de la patología tipo Alzheimer. Dichos efectos neuroprotectores de los estrógenos son mediados por la activación de sus receptores RE- α y RE- β , los cuales se distribuyen en diferentes regiones del cerebro en humanos, ratas y ratones (Shughrue et al., 1997; Mitra et al., 2003; Gonzáles et al., 2007; Pike et al., 2009).

Ambos receptores tienen un rol importante en cuanto a neuroprotección dado que pueden regular la degradación de β A por la enzima degradadora de insulina (IDE, por sus siglas en inglés) a través de la vía PI3K/AKT (Zhao et al., 2011; Tian et al., 2013) además de regular al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), el cual participa en la supervivencia neuronal, sinaptogénesis y maduración sináptica (Lu, 2003; Binder & Scharfman, 2004) o regulando la hiperfosforilación de la proteína Tau mediante la vía miR-218/PTP α /GSK3 β (Xiong et al., 2015; Muñoz-Mayorga et al., 2018). También, le han sido atribuidos efectos sobre la locomoción, como lo reportó Ogawa et al., 2003, quien encontró diferencias y tendencias en el nivel de actividad, distancia total recorrida y tiempo de movimiento de ratones hembras knock-out para los receptores RE- α y RE- β (KoRE- α y KoRE- β , respectivamente). Lo anterior puede indicar una relación estrogénica de la actividad locomotora mediada por los receptores a estrógenos. Es factible que, ante un insulto derivado de la patología en la corteza sensoriomotora, como puede ser la acumulación de β A intraneuronal, hiperfosforilación de Tau o excitotoxicidad mediada por glutamato (Singer et al., 1996), las neuronas y la glía respondan con la síntesis de estradiol, el cual puede proteger a la neurona ya sea debido a sus propiedades antioxidantes para suprimir el estrés oxidativo (Behl et al., 1995, 1997; Calderon et al., 1999) o mediante la activación de su receptor que derive en la activación de cascadas de señalización intraneuronal o

transcripción de genes que lleven a la neuroprotección y mantenimiento de la homeostasis de estas células (McEwen & Alves, 1999; García-Segura et al., 2000; Zhao et al., 2010; Humphreys et al., 2014; Denley et al., 2018).

En contraposición, los machos 3xTg-AD recorren menos distancia (Fig. 12A), pasan más tiempo en reposo (Fig. 12B-C) y menos tiempo en movimiento vertical o levantamientos (12D-E), lo cual es un indicio de un menor nivel de actividad y exploración (Seibenhener & Wooten, 2015). Lo anterior se corroboró por estudios previos en los que reportan una menor distancia recorrida, menor tiempo de exploración y menor número de levantamientos en machos 3xTg-AD (Adeosun et al., 2012; Bories et al., 2012; Blázquez et al., 2014; Baeta-Corral et al., 2015; Chiquita et al., 2019). Sin embargo, los resultados de estos estudios son diferentes de los descritos en otros trabajos (Giménez-Llort et al., 2007; Sterniczuk et al., 2010, Filali et al., 2012), lo que complica su interpretación dado, en parte, a la variabilidad de los diseños experimentales, en donde se emplearon animales de diferente sexo y aparatos de distintos tamaños, así como protocolos y los horarios de las pruebas conductuales dentro del ciclo luz-oscuridad (Schellinck et al., 2010).

Una disminución general en la actividad locomotora y un aumento en el tiempo pasado en la periferia también pueden ser considerados como parte de un comportamiento de tipo ansioso (Liebsch et al., 1998; Sestakova et al., 2013). La ansiedad está estrechamente ligada a la EA, siendo que entre el 5 - 21 % de las personas con demencia pueden presentar desórdenes de ansiedad (Ferreti et al., 2001; Starckstein et al., 2007), además de que la ansiedad es más común en personas con demencia que en individuos sin ella (Porter et al., 2003). Se ha propuesto una relación directa entre ambos factores que puede ser plausible debido a que la neurodegeneración de la EA podría estar alterando áreas límbicas asociadas a la regulación emocional, a la mayor incidencia de la ansiedad en personas con demencia y a que los síntomas de ambos padecimientos suelen ser similares, al grado de superponerse (American Psychiatric Association, 2000; Seignourel et al., 2008). Basándose en lo anterior, nuestros datos indicarían un posible comportamiento de tipo ansioso en los machos transgénicos comparados con las hembras de la misma condición (Fig. 14), sin embargo, se requieren de más pruebas como en el laberinto en cruz elevado, el laberinto cero o la

caja de luz-oscuridad (Sestakova et al., 2013) para poder determinar este tipo de comportamiento.

De acuerdo con nuestros resultados, las deficiencias en la actividad motora de los ratones 3xTg-AD pueden ser atribuidas, al menos parcialmente, a la presencia de neuronas anormales o dañadas en la corteza motora primaria en este mismo modelo, acorde a lo reportado por Orta-Salazar et al. en 2017, y por el daño a nivel de la capa V de la corteza cerebral descrito en otro modelo de la EA (5XFAD) por Jawhar et al. en 2012. Tomando en cuenta lo anterior, resultan ser pocos los estudios de la neuropatología tipo EA que consideran a la corteza sensoriomotora (Frederick et al., 2015), a la vía corticoespinal (Yuan et al., 2013) o a la médula espinal (Wirhth et al., 2007; Wirhth et al., 2008). Más aún, tales deficiencias no se pueden atribuir a una posible alteración en la unión neuromuscular ya que, al utilizar registros isométricos de tensión en el músculo sóleo del modelo 5XFAD, O'Leary et al. en 2018 demostraron que los nervios motores no presentan alteraciones en cuanto a su capacidad para generar una salida de información, lo que permite suponer una alteración a nivel cortical.

8.2 Análisis conductual entre sexos

La prueba de campo abierto, además de incorporar elementos de actividad locomotora, también incluye aspectos relacionados a la exploración, exposición y a la novedad (Morgan et al., 2004), factores que varían dependiendo de las condiciones de la prueba y los grupos experimentales, además del sexo de los animales (Sahgal et al., 1993; Schellinck et al., 2010). En general, se acepta que los roedores hembras son más activos que los machos (Lightfoot et al., 2004; Lightfoot, 2008), sin embargo, nuestros datos indican lo contrario para el caso las hembras No-Tg, siendo que recorren menos distancia, tienen menor número de episodios verticales y tiempo de movimiento vertical y muestran una velocidad menor (Fig. 13A, D, F y G), lo cual indica un menor nivel de actividad y exploración de las hembras No-Tg respecto a los machos No-Tg. Por su parte, las hembras 3xTg-AD, éstas recorren más distancia, pasan menos tiempo en reposo, tienen menor número de episodios de reposo y menor tiempo en movimiento vertical (Fig. 14A-D), lo cual indica un mayor nivel de actividad y exploración de las

hembras transgénicas respecto a los machos 3xTg-AD. La variabilidad de los resultados entre hembras y machos de ambas condiciones puede ser atribuida al impacto de las hormonas sexuales sobre los niveles de actividad de los animales. Por ejemplo, dada la amplia distribución de los receptores a estrógenos RE- α y RE- β en el cerebro (Shughrue et al., 1997; Mitra et al., 2003; Gonzáles et al., 2007; Pike et al., 2009), algunas investigaciones apuntan a un efecto del RE- α sobre la actividad locomotora (Fahrbach et al., 1985; Ogawa et al., 2003) y a la influencia del RE- β sobre los niveles de ansiedad (Krezel et al., 2001). Los efectos de los estrógenos sobre la actividad (en hembras) dependen en gran medida del ciclo estral en que se encuentren, a pesar de la literatura muestre resultados contrapuestos. Archer (1975) propuso que las hembras presentaban un incremento en la actividad motora pero también mayor reactividad a estímulos temerosos (un signo que conlleva a una reducción en la actividad) durante la fase de estro, sin embargo, otros estudios señalan que son menos activas durante el proestro o estro (Diaz-Veliz et al., 1989; Diaz-Veliz et al., 2000). Por su parte, la progesterona por sí misma no tiene efecto directo sobre la actividad locomotora, no obstante, puede modificarla a través de una interferencia con el efecto de los estrógenos (Rodier, 1971; Lightfoot, 2008) mientras que la testosterona puede influir sobre regulación de la actividad locomotora mediante su aromatización en 17 β -estradiol, su metabolización a dihidrotestosterona para actuar vía andrógenos o su metabolización a 3 β -androstaneidol que puede actuar vía RE- β (Roy & Wade, 1975; Broida & Svare, 1983; Celotti et al., 1992; Purves-Tyson et al., 2015). Considerando lo anterior y la variación de nuestros resultados entre sexos (Fig. 13 y 14), es importante considerar que las hormonas sexuales pueden presentar tanto efectos activacionales en la adultez de manera fisiológica como efectos neuroprotectores en el desarrollo de la EA.

8.3 Análisis morfométrico

Las neuronas Csp son células de proyección de largo alcance que proveen a la médula espinal el flujo de información necesario que determina acciones motoras (Oswald et al., 2013; Petrof et al., 2015; Olivares-Moreno et al., 2017). El soma de estas neuronas se ubica en la capa Vb de la corteza sensoriomotora y sus axones recorren la cápsula

interna y los pedúnculos cerebrales hasta llegar a la unión bulbomedular en donde aproximadamente el 80% de los axones decusan de manera contralateral formando el tracto corticoespinal lateral mientras que el 20% restante continúa su trayecto de manera ipsilateral formando el tracto corticoespinal ventral. Ambos tractos inervan directamente a motoneuronas del asta ventral o a interneuronas del asta dorsal que modulan a las motoneuronas (Porter & Lemon, 1993; Lemon, 2008). En este estudio se analizaron a las neuronas CSp de la corteza sensoriomotora del modelo 3xTg-AD (Oddo et al., 2003), con el fin de evaluar el estado morfométrico de estas células durante el curso de la patología tipo Alzheimer en este modelo. Los resultados indican que, para el caso de los machos 3xTg-AD, éstos poseen neuronas CSp de mayor diámetro en cuanto a su soma (Fig. 19A,) además un diámetro de núcleo más grande (Fig. 19B,) y nucléolo más pequeño cuando se comparan con su control (Fig. 19C). La disminución en el tamaño del nucléolo puede ser atribuida a la longevidad de los animales. Se ha reportado que existe una correlación inversa entre el tamaño del nucléolo y la expectativa de vida, siendo que mientras más longevo sea un individuo, el tamaño del nucléolo será menor (Tiku et al., 2017). Además, la esperanza de vida de los ratones 3xTg-AD machos y hembras es menor cuando se comparan con sus controles (Brown et al., 2018; Kane et al., 2018), por lo que es factible pensar que, debido al envejecimiento acelerado que tienen los ratones transgénicos, éstos presenten un diámetro de nucléolo menor cuando se comparan con sus controles.

En relación al aumento en el tamaño del soma y el núcleo, estos resultados pueden ser atribuido a un mecanismo denominado poliploidía neuronal. La poliploidía puede definirse como el incremento del juego cromosómico completo (de $2n$ a $4n$ o $6n$) en células o tejidos de un organismo diploide, incluyendo a murinos y humanos (Mosch et al., 2007; Frade & López-Sánchez, 2017). La tetraploidía puede ser observada en la capa V de la corteza motora de gatos y en los estratos superficiales y profundos de diferentes áreas corticales de murinos como la M1 y la S1 (Herman & Lapham, 1969; Frade & López-Sánchez, 2017; Sigl-Glockner & Brecht, 2017). De manera interesante, la tetraploidía neuronal se ha asociado a neuronas de proyección de largo alcance (Arlotta et al., 2005; Morillo et al., 2010; López-Sánchez et al., 2011; López-Sánchez & Frade, 2013) y se ha demostrado que la amplificación del genoma está acompañada

por un incremento en el tamaño celular (Epstein, 1967; Sigl-Glockner & Brecht, 2017). Así, el tamaño de éstas es mayor al de las células diploides (Morillo et al., 2010), lo cual podría significar que las neuronas se vuelven tetraploides para alcanzar el tamaño necesario y así realizar una función concreta, al igual que ocurre en otros tipos celulares (Edgar & Orr-Weaver 2001; Umen, 2005; Ullah et al., 2009). Además, este fenómeno se ha propuesto como un mecanismo de defensa ante estrés celular, estímulos relacionados a apoptosis, mutaciones que pueden originar cáncer y también para responder a una alta demanda metabólica (Biesterfeld et al., 1994; Ullah et al., 2009; Selmecki et al., 2015). El número de estas neuronas está asociado con la edad y también con enfermedades neurodegenerativas como la EA (Arendt et al., 2010; Yang et al., 2001), en donde ha reportado tanto la presencia de neuronas tetraploides en la corteza como como un aumento en su número (Mosch et al., 2007), de manera que los cambios funciones en neuronas afectadas derivados de cambios morfológicos, podrían participar en la progresión de la patología (Gómez-Jiménez & Frade, 2015). La poliploidía neuronal podría explicar que las células CSp de los ratones 3xTg-AD, al estar sometidas a un estrés celular constante y a una alta demanda metabólica, aumenten el diámetro de su núcleo y, por ende, de su soma para realizar su función correctamente, la cual ya estaría comprometida y se vería reflejada en el menor nivel de actividad de los machos. En este sentido y dada la relación con este mecanismo celular, se requieren de mayores estudios para ahondar en esta hipótesis.

En relación a las neuronas CSp de las hembras 3xTg-AD, se encontró que poseen menor diámetro en cuanto a su soma (Fig. 17A), además un menor diámetro de núcleo y nucléolo cuando se comparan con su control (Fig. 17B y C). Considerando el hecho de que en este modelo transgénico ya ha sido reportado un ligero retraso en el inicio de la patología dado que los machos no exhiben completamente el fenotipo originalmente descrito y que las hembras sí demuestran este fenotipo de manera consistente (Belfiore et al., 2019), la hipótesis es que las hembras 3xTg-AD se encuentran en una fase más avanzada de la patología que los machos, por lo que sus células CSp podrían ya no cumplir completamente su función y disminuir su diámetro (Fig. 12) pero que aún mantengan la neuroprotección por parte de los estrógenos que se vería reflejada en su conducta (Fig. 11; Tabla 3).

Hembras	Variable	Machos
↑ Nivel de actividad	Conducta	↓ Nivel de actividad
↓ Diámetro del soma y núcleo	Tamaño celular	↑ Diámetro del soma y núcleo
No, su fenotipo es consistente y acorde a la EA en pacientes	Retraso temporal de la patología tipo Alzheimer	Sí, no exhiben completamente el fenotipo originalmente descrito
Sí	Neuroprotección de estrógenos	No
Sí	Poliploidía en neuronas piramidales de la capa V	Sí

Tabla 3. Posible relación entre los datos de conducta y diámetro celular con la neuroprotección de los estrógenos y la poliploidía neuronal en cuanto al retraso temporal de la patología tipo Alzheimer en el modelo 3xTg-AD.

9. Conclusiones y perspectivas

El objetivo de este trabajo fue evaluar el estado en el que se encuentran las neuronas corticoespinales de la corteza sensoriomotora en la enfermedad de Alzheimer mediante el análisis morfométrico de las mismas y su relación con la actividad locomotora espontánea. Los resultados demostraron alteraciones en ambas características evaluadas (morfología celular y conducta motora) en el modelo murino de la enfermedad (3xTg-AD), lo cual propone considerar a las neuronas corticoespinales como probables partícipes en el deterioro motor visto en pacientes con Alzheimer y, a la vez, como potenciales blancos terapéuticos de la patología para así mejorar la calidad de vida de millones de personas que la padecen.

10. Literatura citada

- Alzforum. (2019a). 3xTg-AD. Retrieved 14/05, 2019, from <https://www.alzforum.org/research-models/3xtg>
- Alzforum. (2019b). Research Models - Alzheimer's Disease. Retrieved 14/05, 2019, from <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>
- Adeosun, S., Hou, X., Zheng, B., Paul, I., Irwin, R., Brinton, R., & Wang, J. (2012). Motor deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 8(4), P670-P671.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde [About a peculiar disease of the cerebral cortex]. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin*, 64, 146-148.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, 8(6), 429-431.
- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4th Ed. Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Arendt, T., Brückner, M. K., Mosch, B., & Lösche, A. (2010). Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 177(1), 15-20.
- Archer, J. (1975). Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behavioral biology*, 14(4), 451-479.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., & Macklis, J. D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45(2), 207-221.
- Armand, J. (1982). The origin, course and terminations of corticospinal fibers in various mammals. *Prog Brain Res*, 57, 329-360.
- Association, A. s. (2015a). 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Retrieved 04/03, 2016, from <http://www.alz.org/facts/overview.asp>
- Association, A. s. (2015b). Stages of Alzheimer's. Retrieved 06/03, 2016, from http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp
- Baeta-Corral, R., & Giménez-Llort, L. (2015). Persistent hyperactivity and distinctive strategy features in the Morris water maze in 3xTg-AD mice at advanced stages of disease. *Behavioral neuroscience*, 129(2), 129.
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging cell*, 18(1), e12873.
- Biesterfeld, S., Gerres, K., Fischer-Wein, G., & Böcking, A. (1994). Polyploidy in non-neoplastic tissues. *Journal of clinical pathology*, 47(1), 38-42.

- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors* (Chur, Switzerland), 22(3), 123.
- Blázquez, G., Canete, T., Tobena, A., Giménez-Llort, L., & Fernández-Teruel, A. (2014). Cognitive and emotional profiles of aged Alzheimer's disease (3x TgAD) mice: effects of environmental enrichment and sexual dimorphism. *Behavioural brain research*, 268, 185-201.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., & Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 6(3), 131-144.
- Bories, C., Guitton, M. J., Julien, C., Tremblay, C., Vandal, M., Msaid, M., ... & Calon, F. (2012). Sex-dependent alterations in social behaviour and cortical synaptic activity coincide at different ages in a model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(9), e46111.
- Broida, J., & Svare, B. (1983). Genotype modulates testosterone-dependent activity and reactivity in male mice. *Hormones and behavior*, 17(1), 76-85.
- Brookmeyer, R., Corrada, M. M., Curriero, F. C., y Kawas, C. (2002). Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 59(11), 1764-1767.
- Brooks, S. P., & Dunnett, S. B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*, 10(7), 519-529.
- Brown, R. E., Shin, S., Woodland, N., & Rae, E. A. (2018). Genotype and sex differences in longevity in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. In *Conn's Handbook of Models for Human Aging (Second Edition)* (pp. 563-576).
- Buracchio, T., Dodge, H. H., Howieson, D., Wasserman, D., & Kaye, J. (2010). The trajectory of gait speed preceding mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 67(8), 980-986.
- Camicioli, R., Howieson, D., Oken, B., Sexton, G., & Kaye, J. (1998). Motor slowing precedes cognitive impairment in the oldest old. *Neurology*, 50(5), 1496-1498.
- Carroll, J. C., Rosario, E. R., Chang, L., Stanczyk, F. Z., Oddo, S., LaFerla, F. M., & Pike, C. J. (2007). Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *Journal of Neuroscience*, 27(48), 13357-13365.
- Celotti, F., Melcangi, R. C., & Martini, L. (1992). The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Front Neuroendocrinol*, 13(2), 163-215.
- Chiquita, S., Ribeiro, M., Castelhana, J., Oliveira, F., Sereno, J., Batista, M., ... & Gomes, C. (2019). A longitudinal multimodal in vivo molecular imaging study of the 3xTg-AD mouse model shows progressive early hippocampal and taurine loss. *Human molecular genetics*.
- Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D. B., Sun, B., ... & Ho, K. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature*, 469(7328), 47.

- Cox, P. A., Davis, D. A., Mash, D. C., Metcalf, J. S., & Banack, S. A. (2016). Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc Biol Sci*, 283(1823).
- Denley, M. C., Gafford, N. J., Sellers, K. J., & Srivastava, D. P. (2018). Estradiol and the development of the cerebral cortex: an unexpected role?. *Frontiers in neuroscience*, 12.
- De-Paula, V. J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2012). Alzheimer's disease. *Subcell Biochem*, 65, 329-352.
- Diaz-Brinton R. (2012). Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*, 153(8), 3571-3578. doi:10.1210/en.2012-1340
- Diaz-Veliz, G., Soto, V., Dussaubat, N., & Mora, S. (1989). Influence of the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement upon the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. *Physiology & behavior*, 46(3), 397-401.
- Díaz-Véliz, G., Butrón, S., soledad Benavides, M., Dussaubat, N., & Mora, S. (2000). Gender, estrous cycle, ovariectomy, and ovarian hormones influence the effects of diazepam on avoidance conditioning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(4), 887-892.
- Douglas, R. J., & Martin, K. A. (2004). Neuronal circuits of the neocortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 419-451.
- Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7), 699-709.
- Edgar, B. A., & Orr-Weaver, T. L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*, 105(3), 297-306.
- Engelhardt, E., & Gomes Mda, M. (2015). Alzheimer's 100th anniversary of death and his contribution to a better understanding of Senile dementia. *Arq Neuropsiquiatr*, 73(2), 159-162.
- Epstein, C. J. (1967). Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(2), 327.
- Fahrbach, S. E., Meisel, R. L., & Pfaff, D. W. (1985). Preoptic implants of estradiol increase wheel running but not the open field activity of female rats. *Physiology & behavior*, 35(6), 985-992.
- Ferretti, L., McCurry, S. M., Logsdon, R., Gibbons, L., & Teri, L. (2001). Anxiety and Alzheimer's disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 14(1), 52-58.
- Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., & Planel, E. (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behavioural brain research*, 234(2), 334-342.
- Flurkey, K., Curren, J.M. & Harrison, D.E. (2007). *The Mouse in Aging Research The Mouse in Biomedical Research 2nd Edition*: Elsevier.

- Frade, J. M., & López-Sánchez, N. (2017). Neuronal tetraploidy in Alzheimer and aging. *Aging (Albany NY)*, 9(10), 2014.
- Franklin, G. P., & Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. California: Academic.
- Frederick, C., Ando, K., Leroy, K., Héraud, C., Suain, V., Buée, L., & Brion, J. P. (2015). Rapamycin ester analog CCI-779/Temsirolimus alleviates tau pathology and improves motor deficit in mutant tau transgenic mice. *Journal of Alzheimer's disease*, 44(4), 1145-1156.
- García-Porrero, J. A. & Hurlé, J. M. (2015). *Neuroanatomía humana*. Editorial Médica Panamericana.
- García-Segura, L. M., Azcoitia, I., & DonCarlos, L. L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Progress in neurobiology*, 63(1), 29-60.
- Gimenez-Llort, L., Blazquez, G., Canete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobena, A., ... & Fernandez-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(1), 125-147.
- Goedert, M., & Ghetti, B. (2007). Alois Alzheimer: his life and times. *Brain Pathol*, 17(1), 57-62.
- González, M., Cabrera-Socorro, A., Pérez-García, C. G., Fraser, J. D., López, F. J., Alonso, R., & Meyer, G. (2007). Distribution patterns of estrogen receptor α and β in the human cortex and hippocampus during development and adulthood. *Journal of Comparative Neurology*, 503(6), 790-802.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356.
- Herman, C. J., & Lapham, L. W. (1969). Neuronal polyploidy and nuclear volumes in the cat central nervous system. *Brain Research*, 15(1), 35-48.
- Hooks, B. M. (2017). Sensorimotor convergence in circuitry of the motor cortex. *The Neuroscientist*, 23(3), 251-263.
- Humphreys, G. I., Ziegler, Y. S., & Nardulli, A. M. (2014). 17 β -estradiol modulates gene expression in the female mouse cerebral cortex. *PLoS one*, 9(11), e111975.
- INNN. (2010). *Enfermedad de Alzheimer*. Retrieved 03/03, 2016, from <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/alzheimer.html>
- Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., & Grundke-Iqbal, I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1739(2-3), 198-210.
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 33(1), 196-e29.

- Jiménez, Á. G., & López, J. M. F. (2015). Análisis del imprinting genómico en neuronas tetraploides. *cáncer*, 12, 14.
- Kandel, E. (2001). *Principios de neurociencia*: McGraw- Hill.
- Kane, A. E., Shin, S., Wong, A. A., Fertan, E., Faustova, N. S., Howlett, S. E., & Brown, R. E. (2018). Sex differences in healthspan predict lifespan in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 10.
- Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9), 698-712.
- Kirkcaldie, M. (2012). Neocortex. In C. Watson, Paxinos, G., & Puelles, L. (Ed.), *The mouse nervous system*: Academic Press.
- Kozlov, S., Afonin, A., Evsyukov, I., & Bondarenko, A. (2017). Alzheimer's disease: as it was in the beginning. *Reviews in the Neurosciences*, 28(8), 825-843.
- Krężel, W., Dupont, S., Krust, A., Chambon, P., & Chapman, P. F. (2001). Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor β -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12278-12282.
- Lahiri, D. K., & Maloney, B. (2010). The "LEARn"(Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease, and proposes remedial steps. *Experimental gerontology*, 45(4), 291-296.
- Lemon, R. N. (2008). Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci*, 31, 195-218.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., & Landgraf, R. (1998). Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behavioural brain research*, 94(2), 301-310.
- Lightfoot, J. T., Turner, M. J., Daves, M., Vordermark, A., & Kleeberger, S. R. (2004). Genetic influence on daily wheel running activity level. *Physiological genomics*, 19(3), 270-276.
- Lightfoot, J. T. (2008). Sex hormones' regulation of rodent physical activity: a review. *International journal of biological sciences*, 4(3), 126.
- López-Sánchez, N., & Frade, J. M. (2013). Genetic evidence for p75NTR-dependent tetraploidy in cortical projection neurons from adult mice. *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7488-7500.
- Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learning & memory*, 10(2), 86-98.
- Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006247.
- Maquet, D., Lekeu, F., Warzee, E., Gillain, S., Wojtasik, V., Salmon, E., Petermans, J. & Croisier, J. L. (2010). Gait analysis in elderly adult patients with mild cognitive impairment and patients with mild Alzheimer's disease: simple versus dual task: a preliminary report. *Clin Physiol Funct Imaging*, 30(1), 51-56.

- Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 349(9064), 1546-1549.
- Mazzitelli, S., Filipello, F., Rasile, M., Lauranzano, E., Starvaggi-Cucuzza, C., Tamborini, M., Pozzi, D., Barajon, I., Giorgino, T., Natalello, A & Matteoli, M. (2016). Amyloid- β 1-24 C-terminal truncated fragment promotes amyloid- β 1-42 aggregate formation in the healthy brain. *Acta neuropathologica communications*, 4(1), 110.
- McEwen, B. S., & Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine reviews*, 20(3), 279-307.
- Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., ... & McEwen, B. S. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α . *Endocrinology*, 144(5), 2055-2067.
- Mohandas, E., Rajmohan, V., & Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry*, 51(1), 55-61.
- Mobbs, C. V., Gee, D. M., & Finch, C. E. (1984). Reproductive senescence in female C57BL/6J mice: ovarian impairments and neuroendocrine impairments that are partially reversible and delayable by ovariectomy. *Endocrinology*, 115(5), 1653-1662.
- Moreno-López, Y., Olivares-Moreno, R., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2016). Sensorimotor integration by corticospinal system. *Frontiers in neuroanatomy*, 10, 24.
- Moretti, R., Torre, P., Esposito, F., Barro, E., Tomietto, P., & Antonello, R. M. (2013). Apathy as a key symptom in behavior disorders: difference between Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. In *Understanding Alzheimer's Disease*. IntechOpen.
- Morgan, M. A., Schulkin, J., & Pfaff, D. W. (2004). Estrogens and non-reproductive behaviors related to activity and fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(1), 55-63.
- Morillo, S. M., Escoll, P., de la Hera, A., & Frade, J. M. (2010). Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 109-114.
- Mosch, B., Morawski, M., Mittag, A., Lenz, D., Tarnok, A., & Arendt, T. (2007). Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 6859-6867.
- Muñoz-Mayorga, D., Guerra-Araiza, C., Torner, L., & Morales, T. (2018). Tau phosphorylation in female neurodegeneration: role of estrogens, progesterone, and prolactin. *Frontiers in endocrinology*, 9, 133.
- Nelson, J. F., Felicio, L. S., Osterburg, H. H., & Finch, C. E. (1981). Altered profiles of estradiol and progesterone associated with prolonged estrous cycles and persistent vaginal cornification in aging C57BL/6J mice. *Biology of reproduction*, 24(4), 784-794.

- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409-421.
- Ogawa, S., Chan, J., Gustafsson, J. A., Korach, K. S., & Pfaff, D. W. (2003). Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor α : specificity for the type of activity. *Endocrinology*, 144(1), 230-239.
- Olivares-Moreno, R., Moreno-Lopez, Y., Concha, L., Martinez-Lorenzana, G., Condes-Lara, M., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2017). The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Struct Funct*.
- OMS. (2015). Dementia. Retrieved 03/03, 2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es>
- Orta-Salazar, E., Feria-Velasco, A. I., & Diaz-Cintra, S. (2017). Primary motor cortex alterations in Alzheimer disease: A study in the 3xTg-AD model. *Neurologia*.
- Oswald, M. J., Tantirigama, M. L., Sonntag, I., Hughes, S. M., & Empson, R. M. (2013). Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Front Cell Neurosci*, 7, 174.
- O'leary, T. P., Robertson, A., Chipman, P. H., Rafuse, V. F., & Brown, R. E. (2018). Motor function deficits in the 12 month-old female 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*, 337, 256-263.
- Petrof, I., Viaene, A. N., & Sherman, S. M. (2015). Properties of the primary somatosensory cortex projection to the primary motor cortex in the mouse. *Journal of neurophysiology*, 113(7), 2400-2407.
- Pettersson, A. F., Engardt, M., & Wahlund, L. O. (2002). Activity level and balance in subjects with mild Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 13(4), 213-216.
- Pike, C. J., Carroll, J. C., Rosario, E. R., & Barron, A. M. (2009). Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(2), 239-258.
- Platt, T. L., Reeves, V. L., & Murphy, M. P. (2013). Transgenic models of Alzheimer's disease: better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(9), 1437-1448.
- Porter, R., & Lemon, R. (1993). *Corticospinal function and voluntary movement*: Oxford University Press, USA.
- Porter, V. R., Buxton, W. G., Fairbanks, L. A., Strickland, T., O'Connor, S. M., Rosenberg-Thompson, S., & Cummings, J. L. (2003). Frequency and characteristics of anxiety among patients with Alzheimer's disease and related dementias. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 15(2), 180-186.

- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G., Wu, Y., & Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer's Disease International, London.
- Purves-Tyson, T. D., Boerrigter, D., Allen, K., Zavitsanou, K., Karl, T., Djunaidi, V., ... & Weickert, C. S. (2015). Testosterone attenuates and the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, potentiates amphetamine-induced locomotion in male rats. *Hormones and behavior*, 70, 73-84.
- Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., & Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 10(7), 703-711.
- Rodier, W. I. (1971). Progesterone-estrogen interactions in the control of activity-wheel running in the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 74(3), 365.
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, 10 Suppl, S10-17.
- Roy, E. J. & Wade, G. N. (1975). Role of estrogens in androgen-induced spontaneous activity in male rats. *Journal of comparative and physiological psychology*, 89(6), 573.
- Sahgal, A. (1993). Behavioral neuroscience: a practical approach. Oxford University Press, New York.
- Schellinck, H. M., Cyr, D. P., & Brown, R. E. (2010). How many ways can mouse behavioral experiments go wrong? Confounding variables in mouse models of neurodegenerative diseases and how to control them. In *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 41, pp. 255-366). Academic Press.
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (96), e52434.
- Seignourel, P. J., Kunik, M. E., Snow, L., Wilson, N., & Stanley, M. (2008). Anxiety in dementia: a critical review. *Clinical psychology review*, 28(7), 1071-1082.
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4), 487-498.
- Selmecki, A. M., Maruvka, Y. E., Richmond, P. A., Guillet, M., Shores, N., Sorenson, A. L., ... & Pellman, D. (2015). Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature*, 519(7543), 349.
- Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., & Bernatova, I. (2013). Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary toxicology*, 6(3), 126-135. doi:10.2478/intox-2013-0020
- Shen, J., & Kelleher, R. J., 3rd. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2), 403-409.

- Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- α and- β mRNA in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 388(4), 507-525.
- Sigl-Glöckner, J., & Brecht, M. (2017). Polyploidy and the cellular and areal diversity of rat cortical layer 5 pyramidal neurons. *Cell reports*, 20(11), 2575-2583.
- Starkstein, S. E., Jorge, R., Petracca, G., & Robinson, R. G. (2007). The construct of generalized anxiety disorder in Alzheimer disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 15(1), 42-49.
- Sterniczuk, R., Antle, M. C., LaFerla, F. M., & Dyck, R. H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain research*, 1348, 149-155.
- Tian, Z., Fan, J., Zhao, Y., Bi, S., Si, L., & Liu, Q. (2013). Estrogen receptor beta treats Alzheimer's disease. *Neural regeneration research*, 8(5), 420.
- Tiku, V., Jain, C., Raz, Y., Nakamura, S., Heestand, B., Liu, W., ... & Partridge, L. (2017). Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nature communications*, 8, 16083.
- Tortora, G. J., Grabowski, S. R., Werneck, A. L., Esbérard, C. A., & Passos, M. A. F. (2002). *Principios de anatomía y fisiología* (Vol. 7). Oxford University Press.
- Ullah, Z., Lee, C. Y., Lilly, M. A., & DePamphilis, M. L. (2009). Developmentally programmed endoreduplication in animals. *Cell Cycle*, 8(10), 1501-1509.
- Umen, J. G. (2005). The elusive sizer. *Current opinion in cell biology*, 17(4), 435-441.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(5), 1858-1862.
- Welniarz, Q., Dusart, I., & Roze, E. (2017). The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Dev Neurobiol*, 77(7), 810-829.
- Wirh's, O., Weis, J., Kaye, R., Saido, T. C., & Bayer, T. A. (2007). Age-dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiology of aging*, 28(11), 1689-1699.
- Wirh's, O., & Bayer, T. A. (2008). Motor impairment in Alzheimer's disease and transgenic Alzheimer's disease mouse models. *Genes, Brain and Behavior*, 7, 1-5.
- Xie, J., Brayne, C., Matthews, F. E., Medical Research Council Cognitive, F., & Ageing Study, c. (2008). Survival times in people with dementia: analysis from population based cohort study with 14 years follow-up. *BMJ*, 336(7638), 258-262.
- Xiong, Y. S., Liu, F. F., Liu, D., Huang, H. Z., Wei, N., Tan, L., ... & Wang, J. Z. (2015). Opposite effects of two estrogen receptors on tau phosphorylation through disparate effects on the miR-218/PTPA pathway. *Aging cell*, 14(5), 867-877.
- Yang, Y., Geldmacher, D. S., & Herrup, K. (2001). DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 21(8), 2661-2668.

- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive medicine and biology*, 16(1), 4-20.
- Young, N., Stepniewska, I., & Kaas, J. (2012). Motor Cortex. In C. Watson, Paxinos, G., y Puellas, L. (Ed.), *The mouse nervous system*: Academic Press.
- Yuan, Q., Su, H., Zhang, Y., Chau, W. H., Ng, C. T., Song, Y. Q., ... & Lin, Z. X. (2013). Amyloid pathology in spinal cord of the transgenic Alzheimer's disease mice is correlated to the corticospinal tract pathway. *Journal of Alzheimer's Disease*, 35(4), 675-685.
- Zanetti, O., Solerte, S. B., & Cantoni, F. (2009). Life expectancy in Alzheimer's disease (AD). *Arch Gerontol Geriatr*, 49 Suppl 1, 237-243.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. Å. (2010). Estrogen signaling via estrogen receptor β . *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39575-39579.
- Zhao, L., Mao, Z., Schneider, L. S., & Brinton, R. D. (2011). Estrogen receptor β -selective phytoestrogenic formulation prevents physical and neurological changes in a preclinical model of human menopause. *Menopause*, 18(10), 1131-1142.

11. Índice de figuras

Figura 1. Alois Alzheimer y Auguste Deter	12
Figura 2. Placas amiloides y marañas neurofibrilares	14
Figura 3. Desarrollo de las placas amiloides características de la EA	15
Figura 4. Desarrollo de las marañas neurofibrilares en la EA	16
Figura 5. Comparación entre modelos murinos de la EA	17
Figura 6. Caracterización del fenotipo del modelo transgénico 3xTg-AD	18
Figura 7. Comparación de neuronas de M1 entre modelos	20
Figura 8. Circuitos neuronales responsables del control motor	21
Figura 9. Capas de la corteza sensoriomotora	22
Figura 10. Tracto corticoespinal	23
Figura 11. Características conductuales de ratones hembras No-Tg y 3xTg-AD	30
Figura 12. Características conductuales de ratones machos No-Tg y 3xTg-AD	31
Figura 13. Características conductuales de ratones hembras y machos No-Tg	33
Figura 14. Características conductuales de ratones hembras y machos 3xTg-AD	34
Figura 15. Marcaje de las neuronas corticoespinales en la corteza sensoriomotora	35
Figura 16. Correlación entre los diámetros de soma, núcleo y nucléolo de hembras No-Tg	37
Figura 17. Características morfométricas de las neuronas CSp de las hembras No-Tg y 3xTg-AD	38
Figura 18. Correlación entre los diámetros de soma, núcleo y nucléolo de machos No-Tg	39
Figura 19. Características morfométricas de las neuronas CSp de las machos No-Tg y 3xTg-AD	40
Figura 20. Comparativa de las características morfométricas de las células CSp entre sexos	41

12. Índice de tablas

Tabla 1. Características conductuales de los grupos experimentales sometidos a la prueba de campo abierto	29
Tabla 2. Características morfométricas de las neuronas CSp de los grupos experimentales	36
Tabla 3. Posible relación entre los datos de conducta y diámetro con la neuroprotección de los estrógenos y la poliploidía neuronal en cuanto al retraso temporal de la patología.	49