



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

“Efecto del donepecilo y la cerebrolisina en la neuromorfología y actividad motora del ratón”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA:

BIÓL. FAVIOLA ALCÁNTARA GONZÁLEZ

DIRECTORES:

DR. SERGIO ROBERTO ZAMUDIO HERNÁNDEZ

DR. GONZALO FLORES ÁLVAREZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Efecto del donepencilo y la cerebrolisina en la neuromorfología y actividad motora del ratón

Presentada por el alumno:

Alcántara
Apellido paterno

González
Apellido materno

Faviola
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	5	8	2
---	---	---	---	---	---	---

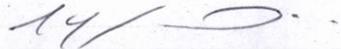
aspirante de:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

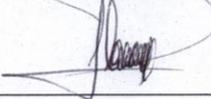
LA COMISIÓN REVISORA

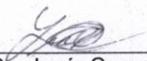
Directores de tesis


Dr. Sergio Roberto Zamudio Hernández


Dr. Gonzalo Flores Álvarez


Dr. Fidel De la Cruz López

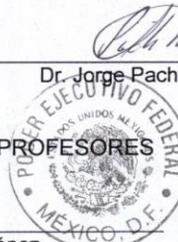

Dr. Abraham Miranda Páez


Dra. Lucía Quevedo Corona


Dr. Jorge Pacheco Rosado

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Manuel Jesús Piñón López



S.E.P.
Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas
Sección de Estudios
de Posgrado
e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 29 de noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Faviola Alcántara González alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Químico-biológicas con número de registro B091582, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Sergio R. Zamudio Hernández y el Dr. Gonzalo Flores Álvarez y ceden los derechos del trabajo intitulado "Efecto del donepecilo y la cerebrolisina en la neuromorfología y actividad motora del ratón", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones zrzamudio@hotmail.com y gonzaloflores56@gmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Faviola Alcántara González

Alumna

Dr. Sergio R. Zamudio Hernández

Director de tesis

Dr. Gonzalo Flores Álvarez

Director de tesis

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología y al Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo brindado durante mi formación.

Becario CONACYT Registro No. 231760

Becario Institucional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN
Registro:503

Becario PIFI Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN

Clave del proyecto: 20110307

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Gonzalo Flores Álvarez del Instituto de Fisiología BUAP, y al Dr. Sergio Roberto Zamudio Hernández, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, por contribuir a mi formación con gran paciencia.

A la Dra. Lucía Quevedo Corona, Dr. Fidel de la Cruz López, Dr. Jorge Pacheco Rosado, y Dr. Abraham Miranda Páez, por la lectura y evaluación de la presente tesis de investigación.

A mis padres por brindarme su amor, comprensión y apoyo en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	I
Índice de fotomicrografías	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VI
Abstract	VIII
I. Introducción.....	1
I.1. Funciones cerebrales y sistema límbico.....	1
I.1.1. Corteza media prefrontal y funciones cognitivas.....	4
I.1.2. Hipocampo.....	5
I.1.3. Amígdala	8
I.1.4. Núcleo accumbens.....	9
I.2. Envejecimiento	10
I.2.1. Envejecimiento del sistema nervioso central.....	11
I.3. Enfermedad de Alzheimer	16
I.4. Clorhidrato de donepecilo	19
I. 5. Factores neurotróficos y plasticidad cerebral.....	24
I.6. Cerebrolisina.....	26
I.7. Morfología y fisiología neuronal.....	29
II. Justificación.....	31
III. Hipótesis.....	32
IV. Objetivos.....	32
IV.1. Objetivo general.....	32
IV.2. Objetivos particulares.....	32
V. Material y métodos.....	33
V.1. Diagrama de trabajo.....	34
V.2. Prueba de “actividad motora en ambiente nuevo y campo cerrado”.....	35
V.3. Tinción Golgi-Cox.....	36
V.4. Análisis microscópico.....	37
V.5. Ubicación de los diferentes tipos de neuronas que se analizarán.....	38
V.6. Criterios generales para la selección de neuronas.....	41

V.7. Análisis de Sholl.....	41
V.8. Análisis estadístico de los datos.....	42
VI. Resultados.....	42
VI.1. Actividad motora.....	42
VI.2. Resultados morfológicos.....	43
VI.2.1. Corteza media prefrontal capa III.....	43
VI.2.2. Corteza media prefrontal capa V.....	46
VI.2.3. Amígdala basolateral.....	48
VI.2.4. Hipocampo dorsal región CA1.....	50
VI.2.5. Hipocampo ventral región CA1.....	52
VI.2.6. Giro dentado	54
VI.2.7. Centro del núcleo accumbens.....	56
VI.2.8. Coraza del núcleo accumbens.....	58
VII. Discusión.....	60
VIII. Conclusiones.....	70
IX. Perspectivas.....	71
Bibliografía.....	72
Fotomicrografías	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. Integración del sistema límbico.....	3
Fig. 2. Conexiones del sistema límbico.....	3
Fig. 3. Corteza cerebral.....	5
Fig. 4. Núcleo accumbens.....	1
Fig. 5. Arborización dendrítica en la vejez.....	13
Fig. 6. Espinas dendríticas en monos.....	13
Fig. 7. Pérdida de espinas por envejecimiento.....	14
Fig. 8. Envejecimiento de neuronas en ratón.....	14
Fig. 9. Placas seniles y marañas por vejez.....	15
Fig. 10. Distribución de marañas y placas en EA.....	18
Fig. 11. Biología molecular de la EA.....	18
Fig. 12. Efecto protector de donepecilo.....	23
Fig. 13. Efectos morfológicos de donepecilo.....	23
Fig. 14. Factores tróficos.....	25
Fig. 15. Mecanismo de acción de CBL.....	27
Fig. 16. Efecto de la combinación de DON+CBL.....	29
Fig. 17. Diagrama de trabajo.....	34
Fig. 18. Caja de actividad motora.....	35
Fig. 19. Microscópio óptico y cámara lúcida.....	37
Fig. 20. Neuronas piramidales de la CmPF capa III y capa V.....	38
Fig. 21. Neuronas piramidales de la ABL.....	39
Fig. 22. Neuronas piramidales y granulosas en hipocampo.....	39
Fig. 23. Neuronas piramidales en HVCA1.....	40
Fig. 24. Neuronas espinosas medianas en el centro y coraza del NAcc	40
Resultados	
Fig. 25. Actividad motora	43
Fig. 26. Arborización y longitud total en CmPF capa III	45
Fig. 27. Longitud por orden y densidad de espinas en CmPF capa III	45
Fig.28. Arborización y longitud total en CmPF capa V.....	47

Fig. 29. Longitud por orden y densidad de espinas en CmPF capa V	47
Fig. 30. Arborización y longitud total en ABL	49
Fig. 31. Longitud por orden y densidad de espinas en ABL	49
Fig. 33. Arborización y longitud total en HDCA1.....	51
Fig. 33. Longitud por orden y densidad de espinas en HDCA1	51
Fig. 34. Arborización y longitud total en HVCA1	53
Fig. 35. Longitud por orden y densidad de espinas en HVCA1	53
Fig. 36. Arborización y longitud total en GD	55
Fig. 37. Longitud por orden y densidad de espinas en GD	55
Fig. 38. Arborización y longitud total en el centro de NAcc	57
Fig. 39. Longitud por orden y densidad de espinas en el centro de NAcc	57
Fig. 40. Arborización y longitud total en la coraza de NAcc	59
Fig. 41. Longitud por orden y densidad de espinas en la coraza de NAcc	59

ÍNDICE DE FOTOMICROGRAFÍAS

F1. Neuronas de CmPF capa III	83
F2. Espinas de CmPF capa III	83
F3. Neuronas de CmPF capa V	84
F4. Espinas de CmPF capa V	84
F5. Neuronas de ABL	85
F6. Espinas de ABL	85
F7. Neuronas de HDCA1	86
F8. Espinas de HDCA1	86
F9. Neuronas de HVCA1	87
F10. Espinas de HVCA1	87
F11. Neuronas de GD	88
F12. Espinas de GD	88
F13. Neuronas del centro en NAcc	89
F14. Espinas del centro en NAcc	89
F15. Neuronas de la coraza en NAcc	90
F16. Espinas de la coraza en NAcc	90

ABREVIATURAS

ABL	amígdala basolateral
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterasa
ADAS-Cog	Subescala cognitiva de Alzheimer.
AM	mígdala
ANOVA	análisis de varianza
APP	proteína precursora de amiloide
ATC	acetiltransferasa de colina
AVT	área ventral tegmental
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
CBL	cerebrolisina
CE	corteza entorrinal
CmPF	corteza media prefrontal
CmPF III	corteza media prefrontal capa tres
CmPF V	corteza media prefrontal capa cinco
CNTF	factor neurotrófico ciliar
DNA	ácido desoxirribonucleico
DON	clorhidrato de donepecilo
EA	enfermedad de Alzheimer
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EP	enfermedad de Parkinson
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
GD	giro dentado
GDNF	factor neurotrófico derivado de una línea celular glial
GH	hormona del crecimiento
HD	hipocampo dorsal
HDCA1	hipocampo dorsal, región CA1
HV	hipocampo ventral

HVCA1	hipocampo ventral, región CA1
IGF-1	factor de crecimiento similar a insulina tipo 1
IGF-2	factor de crecimiento similar a insulina tipo 2
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
LIF	factor inhibidor de la leucemia
MRI	imagen de resonancia magnética
NAcc	núcleo accumbens
NAccC	núcleo accumbens centro
NAccS	núcleo accumbens coraza
NGF	factor de crecimiento nervioso
NOS	óxido nítrico sintasa
NT	neurotrofina
NT 3-7	neurotrofinas 3-7
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PHF	filamentos helicoidales apareados
PLP	potenciación a largo plazo
PS	placas seniles
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
SC	sistema colinérgico
SL	sistema límbico
SN	sistema nervioso
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
SNc	sustancia negra compacta
SNP	sistema nervioso periférico
TAU	proteína de unión a microtúbulos
β A	amiloide beta

RESUMEN

El declive cognitivo asociado a la edad es uno de los grandes cambios de salud que será de mayor estudio en las próximas décadas. Hasta la fecha los mecanismos moleculares del envejecimiento, respecto a la fisiología neuronal en el sistema nervioso central (SNC) no son claros. Hay estudios señalando que el declive de la memoria de trabajo se presenta en los adultos mayores de la misma manera a los desórdenes de memoria presentados en la enfermedad de Alzheimer (EA); además estos cambios se relacionan con cambios estructurales en los circuitos neuronales que involucran áreas del sistema límbico como la corteza prefrontal (CPF) y el hipocampo, lo cual constituye la base de la degeneración progresiva en las diferentes regiones cerebrales.

Es necesaria la investigación de los fármacos que se aplican como tratamiento para EA, el mejor de los casos sería revertir la sintomatología cognitiva.

Para este trabajo, elegimos al clorhidrato de donepecilo (DON), y a la cerebrolisina (CBL), el primero actúa como inhibidor reversible de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), manteniendo la concentración del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en el espacio sináptico y evitando su degradación, mejorando los síntomas cognitivos de la enfermedad. La CBL por su parte, actúa de forma análoga a la de los factores neurotróficos endógenos del cerebro promoviendo la neuroprotección y la neuroregeneración.

Con el fin de probar si el tratamiento combinado de DON+CBL ejerce acción farmacológica aditiva, evaluamos en ratón NIH de siete meses los efectos de la administración intraperitoneal i.p. durante nueve semanas de CBL, DON, y su combinación DON+CBL sobre: La actividad motora y la morfología de neuronas piramidales de las regiones CA1 ventral y dorsal del hipocampo, células granulosas del giro dentado (GD), las piramidales de la corteza prefrontal capas III y V, las piramidales de la amígdala basolateral (ABL), así como las neuronas espinosas medianas del centro y corteza del núcleo accumbens (NAcc). Se formaron cuatro grupos experimentales tratados durante nueve semanas con inyección i.p. diaria de solución vehículo (VEH): Tween 80+agua en proporción 1:4 (1 mL/100 g de peso del animal), grupo DON (0.1 mg/100 g), grupo CBL (0.1 g/100 g), y DON+CBL (DON 0.1 mg/ CBL 0.1 g).

Después del tratamiento, se realizó la prueba conductual de “actividad motora en ambiente nuevo y campo cerrado”, posteriormente se sacrificaron los animales y se extrajeron los cerebros a continuación se trataron con la tinción de “Golgi-Cox” e inmediatamente se prosiguió a realizar los cortes histológicos y revelado de los mismos, finalmente se fijaron los cortes a portaobjetos con resina sintética, y se prosiguió a la representación bidimensional de las neuronas y sus espinas, por medio de un microscopio óptico adaptado a una cámara lúcida. Por último analizamos cada neurona obtenida así como sus espinas distales aplicando la técnica del “Análisis de Sholl” (AS) y evaluando así los parámetros de arborización, longitud por orden dendrítico, y longitud total dendrítica.

Los resultados fueron los siguientes: la actividad motora aumentó en los tres grupos experimentales frente al control (incluyendo al grupo de terapia combinada), sin embargo, no encontramos el efecto aditivo en el tratamiento combinado. Para la corteza media prefrontal (CmPF) capa III, tanto la monoterapia de DON, como la de CBL, aumentaron la arborización dendrítica respecto al control, además de que, en el grupo combinado (DON+CBL) obtuvimos efecto farmacológico aditivo, visto por el aumento de la arborización frente al control y los grupos con monoterapia; respecto a la densidad de espinas distales, tanto las monoterapias como la combinación de ambas drogas, aumentaron la densidad de espinas frente al control, pero sin haber diferencias entre ellas. En la capa V de la corteza media prefrontal, la arborización aumentó en los tres grupos experimentales frente al control, pero sin haber diferencias entre ellos, a excepción de que, en el segundo y tercer orden, aumentó la longitud dendrítica sólo con la terapia combinada. En hipocampo dorsal CA1, la monoterapia con DON no modificó la arborización, pero tanto la de CBL como la terapia combinada de ambas drogas, disminuyó la arborización. Con respecto a la densidad de espinas dendríticas, ésta sólo aumentó con DON. Respecto a la región CA1 del hipocampo ventral, giro dentado, amígdala basolateral, y el núcleo accumbens; tanto la monoterapia de DON como la de CBL aumentaron la arborización, de la misma forma, la terapia combinada de ambas drogas aumentó la arborización, pero sin generar efecto sumatorio, el efecto sobre la densidad de espinas fue el mismo. Por lo tanto, concluimos que el tratamiento con ambas drogas generó efecto aditivo sólo en la corteza prefrontal.

ABSTRACT

Cognitive decline associated with ageing and age-related disorders emerges as one of the greatest health challenges in the next decades. To date, the molecular mechanisms underlying the onset of neuronal physiological changes in the central nervous system (CNS) remain unclear. Studies have indicated the decline in working memory performance in older adults. Similarly, age-related disorders such as Alzheimer's disease (AD), are associated with changes in the prefrontal cortex and related neural circuitry, which underlines the decline of integrative function between different brain regions.

The basal forebrain cholinergic complex comprising medial septum, horizontal and vertical diagonal band of Broca, and nucleus basalis of Meynert provides the major cholinergic projections to the cerebral cortex and hippocampus. The cholinergic neurons of this complex have been assumed to undergo moderate degenerative changes during aging, resulting in cholinergic hypofunction that has related to the progressing memory deficits with aging.

Then, we evaluated the effect of combination of cholinergic (donepezil) and neurotrophic (cerebrolysin) on the locomotor activity induced by a novel environment as well the effect on the morphology of neuronal cells from the brain of major adult male mouse. The DON is a potent and selective acetylcholinesterase inhibitor used in the treatment of Alzheimer's disease. CBL is a mixture of neuropeptides with effects similar to the endogenous neurotrophic factors and is considered one of the best drugs used in the treatment of dementias such as Alzheimer's disease.

NIH male mouse of 7 months old were obtained, the animals were grouped and each mouse was assigned to either a vehicle (water and "Tween 80" solution 1:4 (1 ml/100 g of body weight), group donepezil DON (0.1 mg/100 g), group cerebrolysin CBL (0.1 g/100 g), and the combined group DON+CBL (0.1 mg/ 0.1 g/100 g), and was administered daily for 9 weeks i.p. After treatment the locomotor activity induced by a novel environment was assessed in vehicle, DON, CBL, and DON+CBL, immediately after the animals were sacrificed and the brains were removed and stained using a modified "Golgi-Cox" method. Finally slices of the brains were obtained and fixed with synthetic resin. Pyramidal cells from layers III and V of the PFC, from BLA, area CA1 of the dorsal and ventral hippocampus,

granule cells from the dentate gyrus, and medium spiny neurons of the Shell and core of NAcc were selected for study. We analyzed each neuron and her density distal spines with "Sholl's analysis" (SA) method.

We found that the motor activity was increased in the experimental groups compared to control group, nevertheless we did not find the additive effect in the combined therapy. In the prefrontal cortex layer III the DON monotherapy as well as the CBL monotherapy increased the dendritic branching compared to the control group, besides in the combined group (D+CBL) we find pharmacological additive effect demonstrated by the branching increment compared to the control and monotherapy groups. In the distal spines density both monotherapies as well as the combined therapy increased the spines density compared to the control group, but without showed differences among them.

In the layer V of the prefrontal cortex the branching increased in the experimental groups compared to the control group but without showed differences among them, with the exemption in the second and third order dendritic length only with the combined therapy. In dorsal hippocampus CA1 the DON monotherapy did not modify the branching, however the branching decreased in the CBL and therapy combined groups. The dendritic spine density only increased with the DON monotherapy. In the ventral hippocampus CA1, dentate gyrus, basolateral amygdala, and the shell and core of accumbens nucleus the DON and CBL monotherapies increased the dendritic branching of the same way as the combined therapy also increased the branching but without generating additive effects, a similar effect of the treatments on the spines density in these regions were observed. Cerebrolysin was as effective as donepezil, and the combination of neurotrophic (CBL) and cholinergic (DON) treatment was effective only in the prefrontal cortex.

I.INTRODUCCIÓN

I. 1. FUNCIONES CEREBRALES Y SISTEMA LÍMBICO

La función del cerebro en especies complejas (como la humana) se organiza en múltiples redes o circuitos neuronales, que se van a encargar de la emergencia de funciones cognitivas, como la percepción, atención, inteligencia, pensamiento, procesamiento del lenguaje, aprendizaje y memoria. Todas estas funciones, no se restringen a una zona en particular, las redes neuronales se comunican tanto intra-hemisféricamente, como de forma inter-hemisférica (Acosta y cols., 2011), algunas que participan en la gama de funciones cognitivas son:

1. Red parieto-frontal dorsal para la orientación espacial.
2. Red límbica para la memoria y la emoción.
3. Red perisilviana para el lenguaje.
4. Red occípito-temporal ventral para el reconocimiento de caras y objetos.
5. Red prefrontal para las funciones ejecutivas y del comportamiento.

Existen dos niveles de complejidad que permiten la interacción con el medio ambiente. Uno es el nivel que se considera basal y que hace referencia al procesamiento de la información sensitivo-sensorial, da lugar a respuestas motoras a manera de procesos dependientes del ambiente. El otro es el nivel cognitivo-conductual, el cual permite que la relación con el medio ambiente sea más compleja, originando planificaciones altamente elaboradas de forma estratégica y a través de actos voluntarios; si éste nivel se desestructura, causará al individuo problemas de socialización dando lugar a esquemas conductuales más primitivos, originados por el primero de los dos niveles antes descrito (Acosta y cols., 2011).

La red límbica integra diversas estructuras anatómicas que rodean como un anillo al tronco y cuerpo calloso cerebral en la superficie media del cerebro, en 1878 Pierre Paul Broca lo nombró al inicio “lóbulo límbico”, posteriormente C. Judson Herrick observó que el sentido del olfato tiene una importante función conductual en animales primitivos, por lo tanto, la corteza olfatoria se incorporó al circuito límbico dando origen al “rinencéfalo” hecho propuesto por J. Papez quien además propuso que el papel fundamental de estas estructuras es el procesamiento de la información emocional (Soriano y Guillazo, 2007).

Ya en 1952 Paul MacLean acuñó el término “sistema límbico”, el cual no sólo modula las emociones sino que también se le atribuye la consolidación de la memoria de corto a largo plazo, se encuentra integrado anatómicamente (fig.1) por las siguientes estructuras: corteza cingular, el giro subcalloso, el giro parahipocampal, la formación hipocampal, la corteza olfativa, y las estructuras subcorticales como el hipotálamo, el septum, el epitálamo, la habénula, el núcleo anterior y dorsomedial del tálamo, parte de los ganglios basales, así como la amígdala, (Soriano y Guillazo, 2007). Por lo tanto, las funciones del sistema límbico son: la modulación de las emociones, y consolidación de la memoria de corto a largo plazo recibiendo información de diversas estructuras corticales como las gustativas (por medio del núcleo solitario) y áreas olfativas (por medio del bulbo olfatorio), también recibe información de áreas talámicas y del tallo cerebral como la que llega del locus coeruleus (Hikosaka y cols., 2008; Rajmohan y Mohandas, 2007).

Respecto a las interconexiones de neurotransmisión intrínseca que fluyen a través de las redes límbicas, la corteza media prefrontal (CmPF) con proyecciones glutamatérgicas, la amígdala con proyecciones dopaminérgicas, y el hipocampo con proyecciones glutamatérgicas llegan en conjunto al núcleo accumbens éste último, se divide en dos regiones funcionales la coraza de carácter límbico y el centro de carácter motor, la coraza tiene aferencias de la CPF, amígdala e hipocampo, y del centro del accumbens parten eferencias de tipo gabaérgicas al pálido ventral del tálamo (PV) el pálido ventral, por su parte envía proyecciones gabaérgicas al tálamo medio dorsal, y éste último envía proyecciones glutamatérgicas a la CmPF (Del Arco y Mora., 2009; Heinz y cols., 2008; Rajmohan y Mohandas., 2007), (fig. 2).

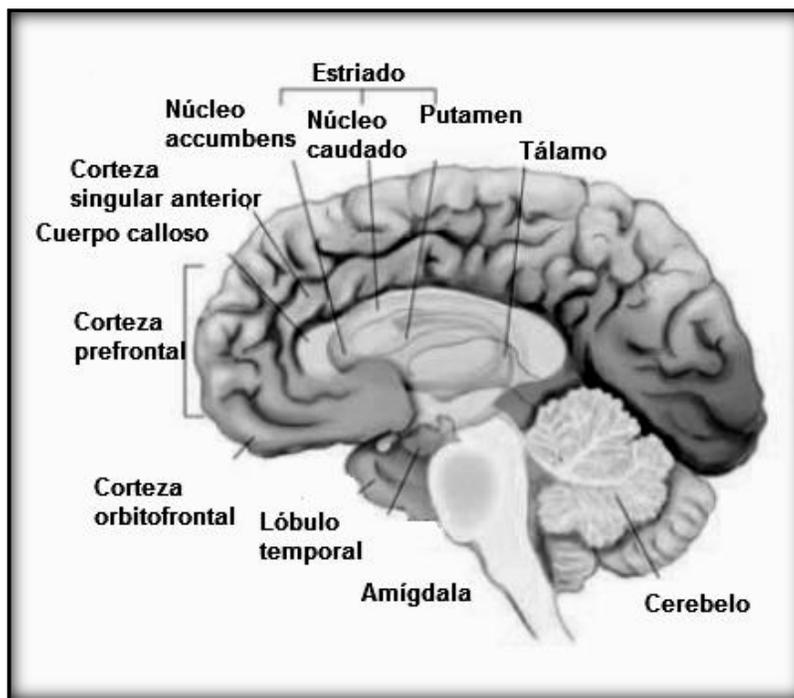


Fig. 1. Integración anatómica del sistema límbico, que incluye estructuras corticales y subcorticales, (Aguilar y cols., 2010).

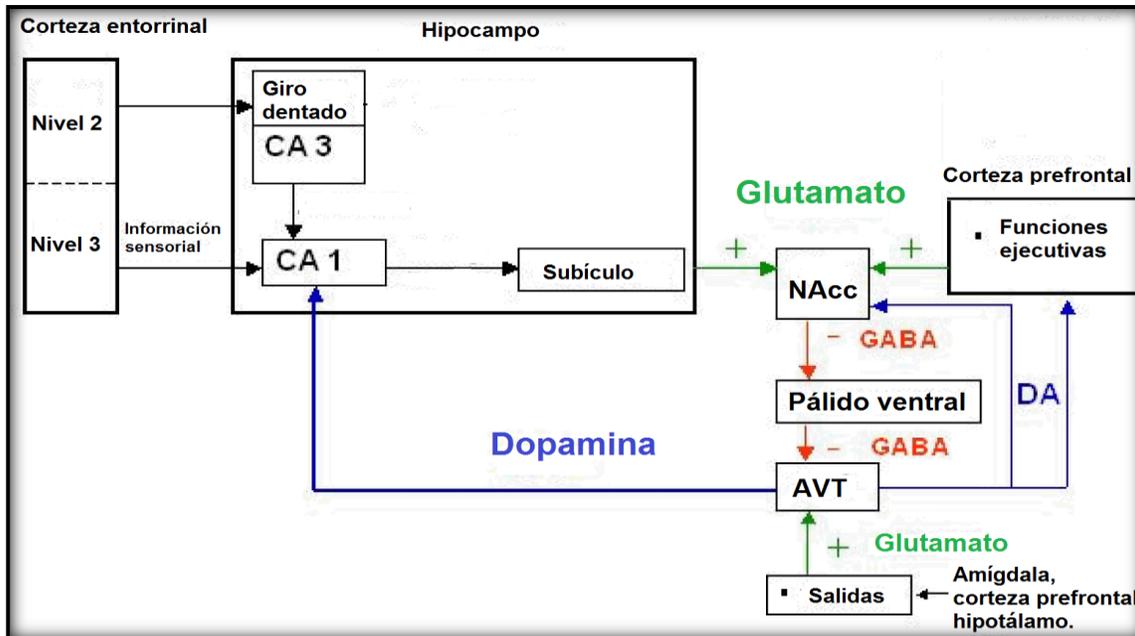


Fig. 2. Proyecciones principales de neurotransmisores en el sistema límbico (Heinz y cols., 2008).

I.1.1. CORTEZA MEDIA PREFRONTAL Y FUNCIONES COGNITIVAS

La corteza prefrontal es de tipo asociativa se encarga de las funciones cognitivas superiores complejas, como el procesamiento de la memoria, del razonamiento o formación de la consciencia, y últimamente se le atribuye cierta función inhibitoria emotiva permitiendo la generación de cambios conductuales, según como evalúe los estímulos recibidos por lo tanto tiene importancia fundamental en la toma de decisiones (Martínez-Selva y cols., 2006).

La corteza prefrontal recibe información de la mayoría de las estructuras cerebrales, consiste en una agregación de cuerpos neuronales, caracterizada por su diversidad estructural, neuroquímica y funcional altamente compleja (fig. 3), las neuronas de la corteza prefrontal reciben estímulos desde muchas estructuras subcorticales sensoriales tras pasar por el tálamo (Carretié y cols., 2010), y también desde otras regiones de la propia corteza por medio de fibras de asociación hacia las estructuras subcorticales, fibras callosas hacia la corteza del hemisferio opuesto, fibras de asociación hacia la corteza del mismo hemisferio, y fibras tálamo corticales que aportan todos los estímulos nerviosos de la corteza que se originan en estructuras no corticales; a su vez estas neuronas proyectan hacia un amplio abanico de estructuras nerviosas entre ellas áreas de la corteza cerebral, el tálamo, los núcleos basales, el cerebelo (a través de los núcleos del puente), muchos de los núcleos del tronco del encéfalo y la médula espinal, por lo tanto, la corteza cerebral procesa la información sensitiva que llega además de organizar la actividad motora (Alegri y Harris, 2001; Carretié y cols., 2010; Castro-Alamancos, 200; Fuster, 2001; Haines y cols., 2003; Heinz y cols., 2008; Puig y cols., 2004; Vertes, 2006).

En humanos la corteza prefrontal se encuentra en las áreas 24, 25, 32, y 10 de Brodmann, y se tienen reportes de que ciertas áreas anatómicas y funcionales de la rata son homólogas a las de la corteza prefrontal del humano, entonces se sugiere que en los roedores las regiones como la cingulada anterior (ACg1), la prelímbica (PL), y la infralímbica (IL) son equivalentes a las regiones 24 y 25 en humanos, tanto la PL como la IL controlan la actividad autónoma visceromotora, aunque la IL con mayor intensidad, también participan en funciones de atención, selección de respuestas, y memoria operativa, la PL participa más en funciones límbico-motoras, (Floyd y cols., 2001; Groenewegen y Uylings, 2000; Saper, 2000; Vertes, 2006).

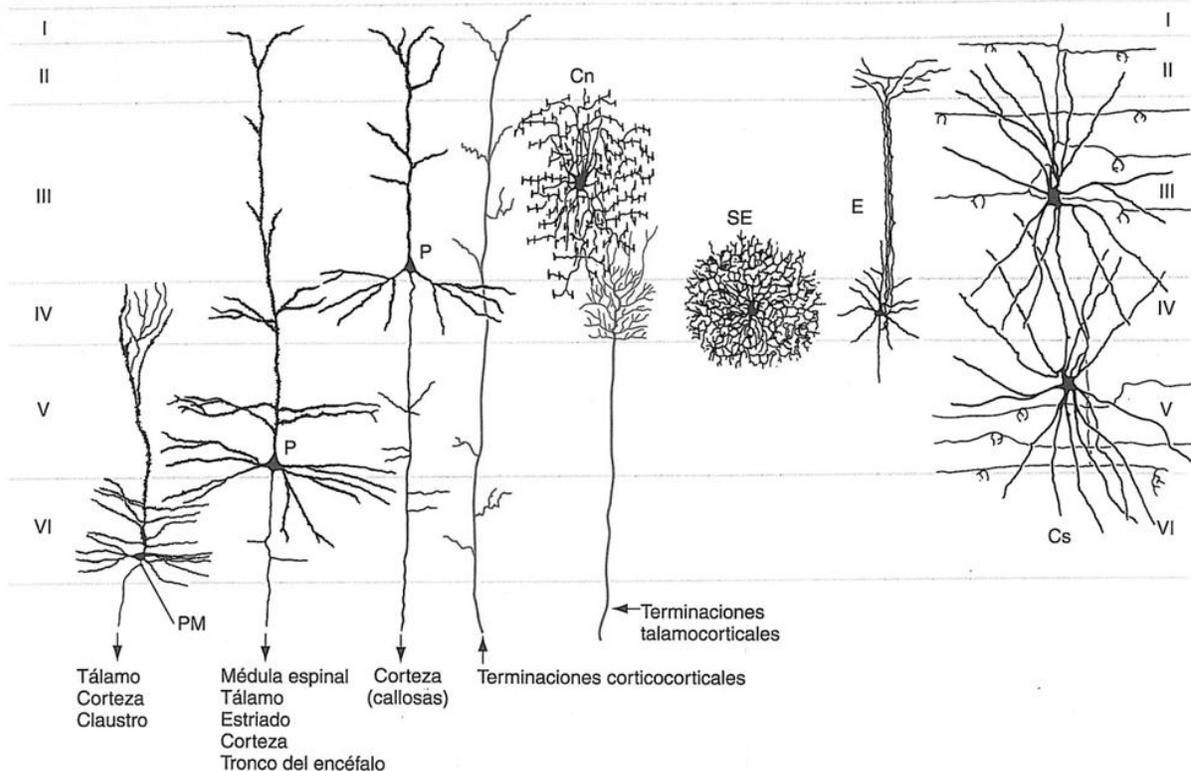


Fig. 3. Tipos celulares representativos de la corteza cerebral, y capas en las que se encuentran sus somas celulares y dendritas. Las dendritas de las células piramidales (P) de las capas II, III, y V se extienden hacia la capa I, mientras que, en el caso de las células piramidales modificadas (PM) de la capa VI, sólo llegan aproximadamente hasta la capa IV. Las células en candelabro (Cn) quedan limitadas casi totalmente a la capa III. Los cuerpos de las neuronas estrelladas espinosas y sin espinas (E, SE) están en la capa IV, aunque sus prolongaciones se extienden hacia las otras capas. Las células en cesto (Cs) tienen prolongaciones que en conjunto se extienden hacia todas las capas corticales; sus cuerpos celulares se sitúan sobre todo en las capas III y V, (Haines y cols., 2003).

I.1.2. HIPOCAMPO

El hipocampo es una estructura formada por varias regiones, diferentes en cuanto a su estructura citoarquitectónica y funcional, tales regiones son, el hipocampo propiamente dicho, el giro dentado (ambos separados por la fisura hipocámpica), el complejo subicular (formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum), y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989); el hipocampo se relaciona con la corteza prefrontal, con el núcleo accumbens, la amígdala, y el área ventral tegmental para formar al “sistema dopaminérgico mesolímbico” importante en funciones de aprendizaje y memoria, además en la regulación de conductas motivacionales, (Vallone y cols., 2000).

Su diversidad celular se conforma por tres capas la molecular, la que alberga las células granulares, y la polimórfica. Amaral y cols., en el 2007 proponen la organización anatómica de cada región hipocámpica de la siguiente manera, empezamos con el giro dentado (GD)

el cual está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas "*stratum granulare*", éstas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales designados como fibras musgosas, en la capa más cercana a la fisura hipocámpica la del "*stratum moleculare*", se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del giro dentado, se llama "*hilus*", y se caracteriza por su naturaleza polimórfica, se conforma por gran variedad de tipos celulares entre las cuáles las células musgosas son mayoritarias. Entre el "*stratum granulare*" y el "*hilus*" del GD, se puede distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta. Las neuronas granulares del giro dentado proyectan sus axones, fibras musgosas hacia las dendritas proximales de las neuronas piramidales de la CA3, atravesando el "*hilus*", las células granulares del giro dentado no proyectan hacia fuera de la formación hipocámpica, sin embargo reciben axones provenientes del hipotálamo (Amaral, 1979).

El hipocampo propiamente dicho (cuerno de Amón), está dividido en tres áreas: CA1, CA2, CA3, y CA4 (en humanos), la zona más distal designada como CA1 se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal está formada por la CA2 y CA3 la cual es rica en células piramidales de mayor tamaño. El área CA1 se localiza en el límite entre el subículo y el hipocampo, el área CA2 y CA3 se sitúan dentro del hipocampo, y la CA4 se encuentra en la unión del hipocampo con la circunvolución dentada dentro del hilio de ésta última. Las distintas áreas están estratificadas así en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras "*el alveus*" o sustancia blanca, posteriormente encontramos una capa estrecha "*el stratum oriens*", formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales las cuales conforman el "*stratum pyramidale*" de naturaleza glutamatérgica, a continuación encontramos el "*stratum radiatum*" formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales, y en la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpica) encontramos el "*stratum lacunosum moleculare*" que alberga las ramificaciones distales de las dendritas apicales. En las neuronas piramidales, únicamente en el área CA3 entre el "*stratum pyramidale*" y el "*stratum radiatum*", es posible encontrar un estrecho estrato acelular formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de la CA3 proyectan sus axones hacia las dendritas de las neuronas piramidales de la CA1, mediante los

colaterales de Schaffer además, axones provenientes de la CA3 proyectan hacia todas las áreas del hipocampo propiamente dicho, a través de proyecciones comisurales entre hemisferios, y/o asociativas, en el mismo hemisferio.

La información que entra a la formación hipocámpica, procede de las células de la corteza entorrinal a través de una proyección difusa llamada vía perforante. La corteza entorrinal se encuentra dividida en seis capas corticales bien definidas, las capas II y III están densamente pobladas por pequeñas células que envían sus axones para otras áreas hipocámpicas las capas V y VI están formadas por neuronas grandes que envían sus axones hacia fuera de la formación hipocámpica, las capas I y IV son acelulares, la mayor entrada de fibras en el hipocampo provienen de la corteza entorrinal, las células de las capas II y III envían sus axones hacia el giro dentado y el hipocampo propiamente dicho a través de la vía perforante, atravesando la capa de células piramidales del "*subiculum*" (Amaral y cols., 1989).

La formación hipocámpica posee un circuito trisináptico excitador que tiene inicio en la vía perforante de la corteza entorrinal cuyas proyecciones contactan con las células granulares del giro dentado, las cuáles envían sus axones (fibras musgosas) hacia las neuronas piramidales de la CA3, y éstas a su vez envían sus axones hacia las neuronas piramidales de la CA1 mediante los colaterales de Schaffer la principal conexión externa de la formación hipocámpica se establece con el "*septum*".

Las neuronas de la CA3 envían sus axones fuera de la formación hipocámpica únicamente a la región septal, y las neuronas de la CA1 poseen proyecciones mayoritariamente hacia la región septal, pero también hacia las cortezas frontal, retrosplenial y perirrinal, así como hacia el bulbo olfatorio, la amígdala y el hipotálamo.

I.1.3. AMÍGDALA

Es un sistema de núcleos límbicos, relacionado con varias funciones como cognitivas, conductuales como la actividad motora y la exploratoria, así como la de toma de decisiones, funciones emocionales, además modula la memoria (Kalivas y Volkow, 2005; MacGaugh, 2004; Torras y cols., 2001), se conforma por dos áreas estructurales a la primera se le llama amígdala basolateral (ABL), y se conforma por los núcleos lateral, basomedial y basolateral, sus proyecciones neuronales son de tipo glutamatérgicas.

La segunda área se llama núcleo centromedial amigdalino (ACM) que tiene conexiones estriatales gabaérgicas, las entradas de información que llegan a la amígdala son vías de tipo excitatorias glutamatérgicas, quienes forman conexiones con las dendritas de neuronas que proyectan hacia otras regiones de la misma amígdala o bien, hacia regiones extrínsecas (Almaguer-Melián y Bergado-Rosado, 2002; Castro-Sierra y cols., 2005).

Hay fibras que suministran información ejecutiva y somatosensorial al complejo amigdalino, específicamente hacia la ABL, estas llegan del tálamo, cortezas sensoriales, corteza prefrontal, hipocampo ventral, y el área ventral tegmental. Las vías eferentes de la ABL van hacia la CPF, hipocampo ventral, tálamo, núcleo accumbens, y el caudado putamen, la ABL es la que proyecta información a la ACM la cual también recibe información de bulbos olfatorios, de cortezas viscerosensoriales, de la prefrontal, así como del tallo cerebral involucradas en funciones viscerales. La ACM envía información al hipotálamo, núcleo de rafé, locus coeruleus, y a núcleos viscerales como el nervio vago motor, (Heimer, 2004; Malin y MacGaugh, 2006).

Hay reportes que proponen a la ACM como implicada en la asociación entre estímulos y reforzadores (controlando la emoción), y a la ABL se le involucra en las respuestas y la activación emotiva (controlando la ejecución), (Del Arco y Mora, 2009; Hamann y cols., 1999; Pape y Pare, 2010).

1.1.4. NÚCLEO ACCUMBENS

Como elemento fundamental del sistema límbico el núcleo accumbens (NAcc) es un núcleo del prosencéfalo basal cercano al septum, recibe terminales de neuronas del área ventral tegmental (AVT), y está involucrado en el refuerzo y la atención (fig.4). Lo llaman el centro del placer y la adicción. Junto con el bulbo olfatorio, forma colectivamente la parte ventral del cuerpo estriado, y este a su vez forma parte de los ganglios basales (Fernández-Espejo, 2000; Heimer, 2004; Kalivas y Volkow, 2005).

De forma anatómica y funcional, se divide en dos áreas: el núcleo y la coraza, esta última presenta conexiones límbicas aferentes de tipo glutamatérgico del hipocampo y la amígdala, así como entradas dopaminérgicas del AVT (fig. 4), el núcleo del NAcc es una extensión del estriado dorsal recibe aferencias glutamatergicas de la CPF, y dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNc), sus vías de salida son gabaérgicas y proyectan hacia el pálido ventral (PV) formando parte de conexiones motoras cortijo-estriado-pálido-talámicos (Klärner y cols., 1998; Mesulam y Geula, 1988; Viggiano y cols., 2003).

Las células dopaminérgicas son aferentes al cuerpo estriado y ejercen un control inhibitorio muy importante sobre la actividad de las interneuronas colinérgicas, estas vías colinérgicas se proyectan desde los núcleos basales de Meynert, al cortex (frontal y parietal principalmente), y al tálamo, amígdala e hipocampo (Alquicer y cols., 2004; Castro-Alamancos, 2003; Fernández-Espejo, 2000).

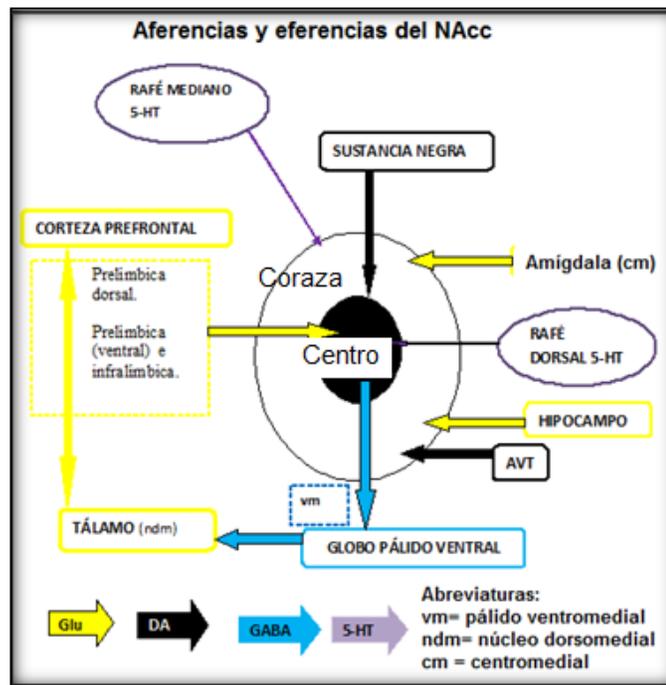


Fig. 4. Aferencias y eferencias en la coraza del accumbens cuya función es límbica, de igual forma las del centro al cual se le atribuye función motora (Fernández-Espejo, 2000).

I.2. ENVEJECIMIENTO.

El envejecimiento es la penúltima fase del ciclo de vida de los sistemas biológicos, se presenta inmediatamente después de la madurez, por ahora es irreversible y se caracteriza por la disminución de la eficiencia biológica, así como deficiencia progresiva en la capacidad del organismo para adaptarse a los cambios del medio ambiente, consiste en la atrofia de células y tejidos así como de los sistemas en general que integran al organismo, (Johnson y Sinclair, 1999; Lamberts y cols., 1997; Ruiz-Torrez y Hofecker, 2003).

El envejecimiento, se caracteriza en primates evolucionados, por signos físicos y conductuales principalmente que son originados por los cambios fisiológicos antes mencionados, pero además, podemos distinguir de forma más exhaustiva cambios moleculares y celulares que finalmente reflejan el estado físico del anciano, en el cual se observa piel arrugada, adelgazamiento, caída y decoloración del cabello, pérdida de dientes, atrofia de las gónadas, encorvamiento de la columna vertebral, y disminución

progresiva de la agilidad motora, entre otras características (Gil-Gregorio, 2000; Ropper, 2005).

Dentro de los cambios de tipo fisiológico más evidentes durante el proceso del envejecimiento son: pérdida de agudeza visual y auditiva, disfunción progresiva de las capacidades cognitivas, así como deficiencia progresiva en todos los sistemas que integran el cuerpo. Los cambios celulares se refieren al incremento de las reacciones de oxidación lo cual favorece la liberación de especies reactivas al oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), ocasionando daño oxidativo, acumulación de mutaciones en ADN y daño consecuente a proteínas y membrana celulares, tal proceso está relacionado directamente con la posibilidad de desarrollar neurodegeneración progresiva (Mattson y cols., 2008; Meissner, 2007; Mattson y Magnus, 2006), proceso que últimamente tiene un impacto fuerte en la especie humana, y al cual se le atribuyen como factores de causa principales (entre otros) el estilo de vida y los cambios medio-ambientales que hemos sufrido en los últimos años.

I.2.1. ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La vejez en el sistema nervioso central (SNC) refleja “disminución progresiva de la longitud dendrítica y pérdida de espinas”, incluso disminución del tamaño del soma neural así como pérdida de neuronas en hipocampo y corteza cerebral (figuras 6, 7, y 8), (Bartrés-Faz y Junqué, 1999; Duan y cols., 2003; Mattson y Limke, 2005).

El tipo de espinas en las neuronas corticales puede variar de un organismo joven a otro viejo (Penzes y cols., 2011; Dimitriu y cols., 2010), como consecuencia de lo anterior, disminuye la memoria episódica, las capacidades intelectuales, el metabolismo cerebral de la glucosa, así como el volumen y peso del cerebro, conductualmente se tiende a la repetición o al olvido (Bano y cols., 2010; Dickstein y cols., 2007; Kabaso y cols., 2009).

El medio ambiente influye en la plasticidad neuronal entendiéndose a ésta última como la capacidad de las neuronas de sufrir cambios en el número, tipo, morfología y función de sus conexiones nerviosas, (Nieto-Sampedro, 2003; Wong, 2000; Wu y cols., 2002).

En un estudio morfológico de neuronas corticales con ratones seniles (mayores de 10 meses de edad), sometidos a un ambiente enriquecido (diversos estímulos físicos, visuales, táctiles, etc.), o bien a un ambiente empobrecido (pocos estímulos, o sin

estímulos), los organismos viejos pierden neuronas en mayor grado que los jóvenes y sólo bajo ambiente enriquecido mantienen mejor (pero no igual que los jóvenes) sus neuronas corticales (fig. 9), (Tresguerres, 2005).

Con el paso del tiempo hay tendencia a la disminución progresiva de la capacidad plástica que posee el SNC para recuperarse (fig. 6), (Bloss y cols., 2011; Kolb y cols., 1998; Mattson y Magnus, 2006).

Se sabe además que con el paso de la edad hay tendencia a la formación de placas seniles (PS) las cuales son agregados amorfos de proteína amiloide, característica encefálica de pacientes humanos (no necesariamente diagnosticados con algún tipo de demencia), estas PS se originan en el hipocampo, corteza entorrinal adyacente, y más tarde pueden aparecer en otras áreas del encéfalo (fig.9), (Morrison y Hof, 1997).

Por lo tanto la edad avanzada, daño en la memoria y EA no son un continuo, de hecho el envejecimiento de las neuronas no necesariamente refleja predisposición a EA además, estudios conductuales y electrofisiológicos en roedores y primates no humanos de edad avanzada sugieren que, la función de circuitos hipocámpicos sufre un declive que no siempre refleja pérdida de neuronas (Morrison y Hof., 1997), lo anterior sigue siendo tema de controversia, sin embargo: “es un hecho que el envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes para adquirir enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, o bien la enfermedad de alzheimer” (Bishop y cols., 2010; Mattson y Magnus., 2006).

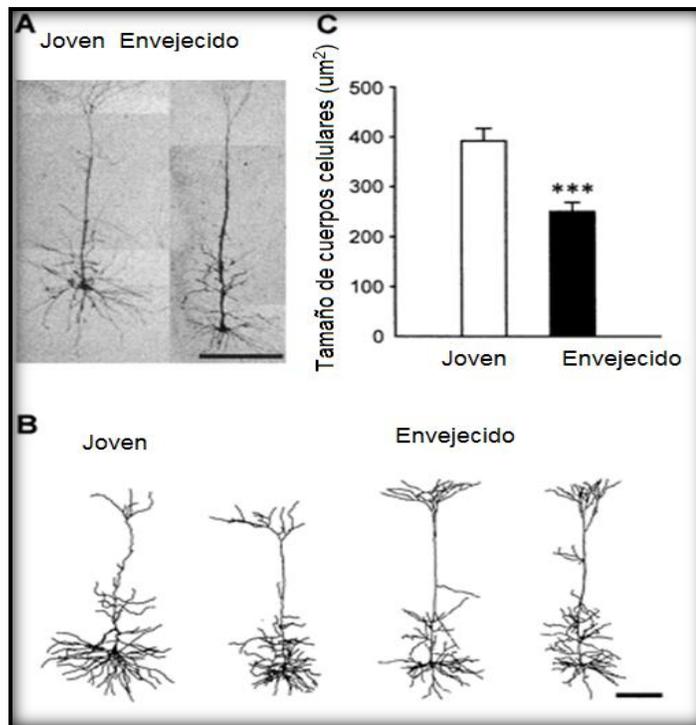


Fig 5. En A y B se observan imágenes representativas que comparan la arborización dendrítica en neuronas piramidales de la CmPF capa V, tanto de ratas jóvenes (2 meses) y viejas (8-37 meses), se aprecia la retracción dendrítica para las neuronas viejas. En C observamos una gráfica que indica los valores (en μm^2) del tamaño de los cuerpos celulares de las mismas neuronas piramidales, (Wong, 2000).

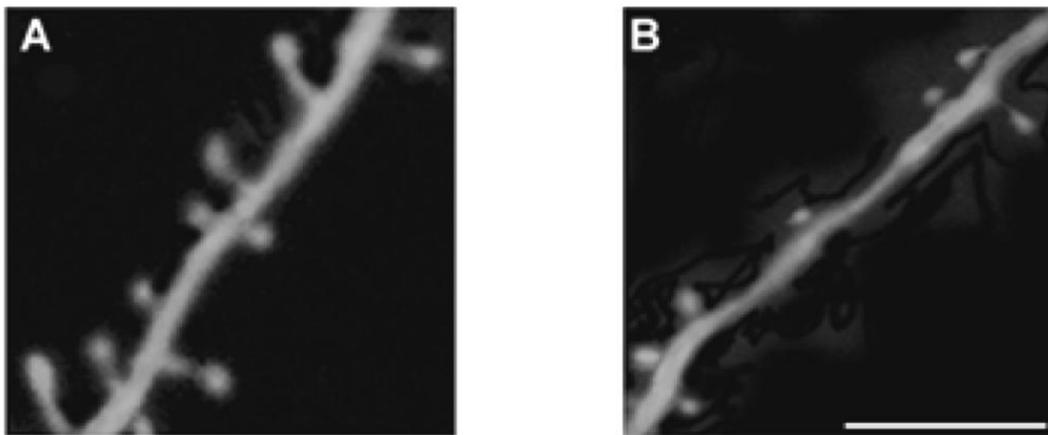


Fig. 6. En A y B, se muestran segmentos dendríticos de neuronas piramidales en la corteza frontal del mono rhesus, con sus respectivas espinas; se observa que hay disminución del número de espinas dendríticas en B correspondientes a animales viejos, comparadas con la densidad de espinas en A de animales jóvenes, (Dickstein y cols., 2007).

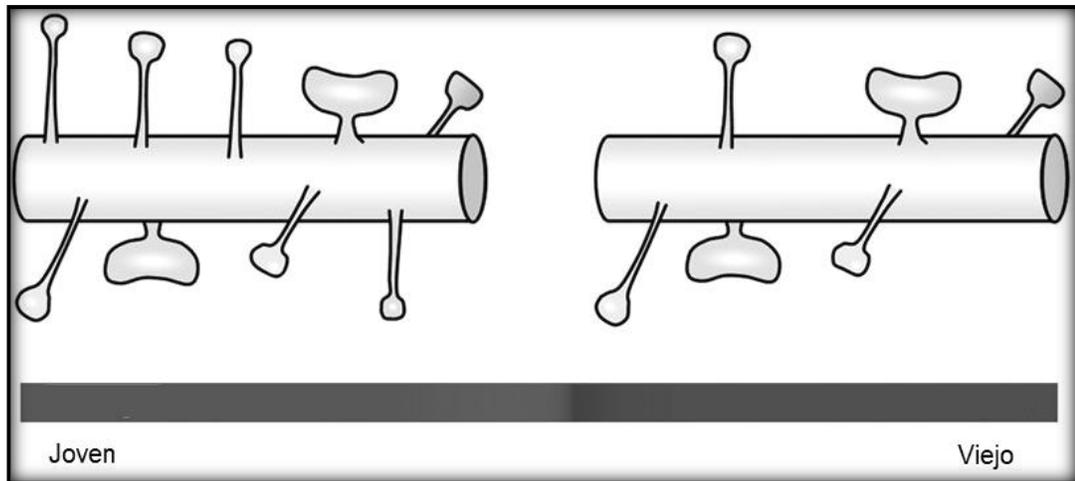


Fig. 7. Imagen que representa la pérdida de espinas delgadas (relacionadas con funciones de memoria y aprendizaje), y la prevalencia de las gruesas, en las dendritas de neuronas corticales en la CPF de macacos con edad avanzada (Dimitriu y cols., 2010).

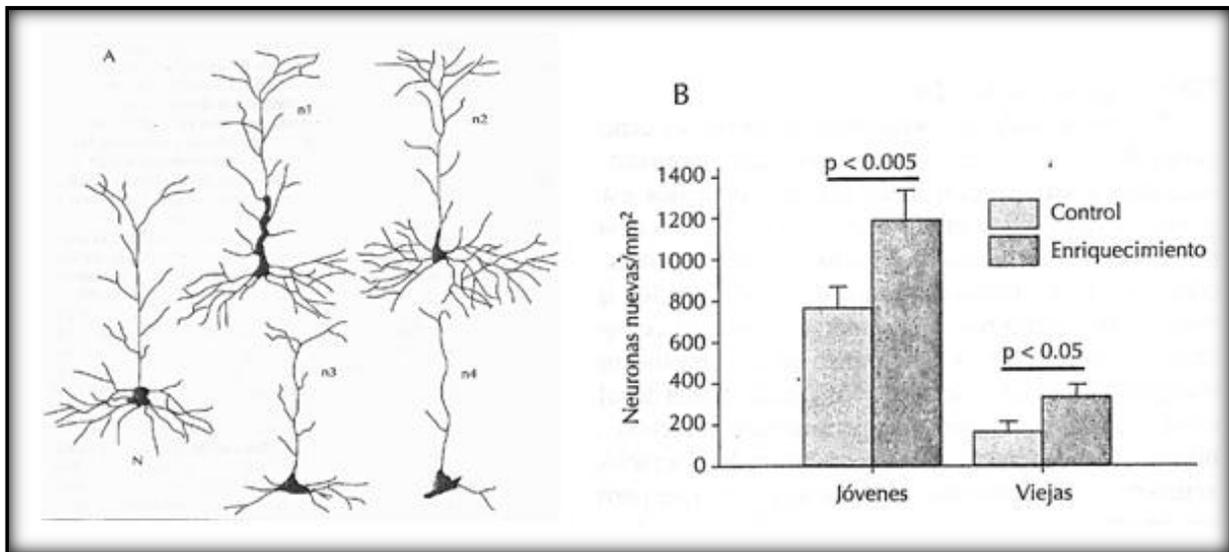


Fig. 8. Durante el proceso de envejecimiento, las neuronas pueden mostrar un aumento progresivo de su árbol dendrítico (bajo condiciones de enriquecimiento ambiental N, n1, n2), o bien, una regresión de dicho árbol dendrítico (Sin enriquecimiento ambiental N, n3, n4). En B el enriquecimiento ambiental produce un aumento significativo de la renovación de las neuronas nuevas del hipocampo, tanto en animales jóvenes como en animales viejos, (Tresguerres., 2005).

Hay otros marcadores celulares observados en el envejecimiento normal que se encuentran también más marcados en la EA, en comparación con el envejecimiento normal, tal es el caso de la disminución del metabolismo energético de la glucosa, observados por tomografía por emisión de positrones TEP (Mattson, 2004), otras

moléculas como los gránulos de lipofucsina se acumulan gradualmente conforme avanza la edad; en las neuronas talámicas de primates y humanos envejecidos, se ha observado también que las placas neuríticas (PN) de cerebros con EA presentan esta molécula en mayor cantidad, así como la tendencia al aumento de la proteína fosfatasa tirosina (STEP por sus siglas en inglés) (Zhang y cols., 2010), de igual forma se acumula la lipofucsina, el hierro, y otros cuerpos pigmentarios durante el envejecimiento independientemente de si hay o no enfermedad neurodegenerativa, (Ropper, 2005).

En relación a los cambios en los neurotransmisores por envejecimiento se sabe que disminuyen las neuronas colinérgicas de los núcleos basales de meynert, así como la síntesis de acetilcolina (ACh) por disminución funcional de la acetiltransferasa de colina (AChT) en hipocampo y áreas corticales, (Billard, 2006; Gil y cols., 2000; Rylett y Williams, 1994).

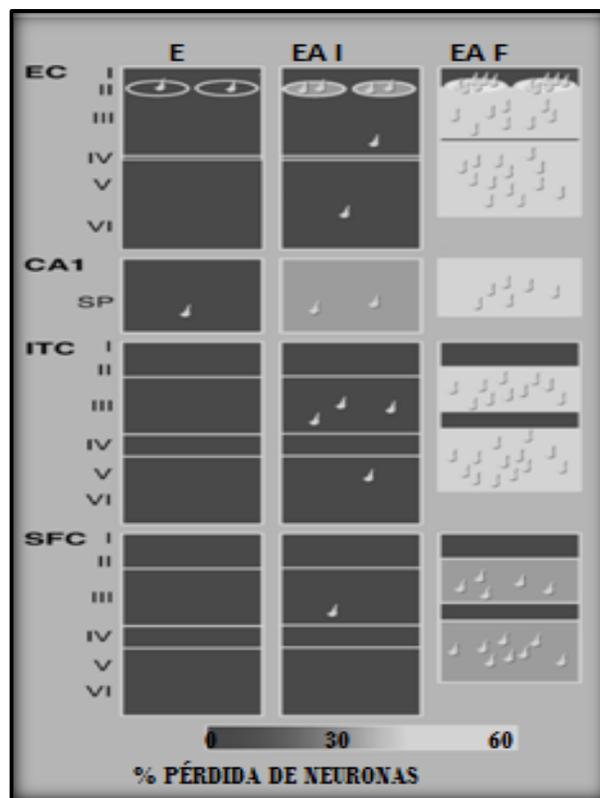


Fig. 9. Observamos un cuadro que representa la formación de placas seniles en cerebros de pacientes con EA comparados con cerebros de pacientes viejos sin el diagnóstico de EA, las abreviaturas: E (Individuos envejecidos sin alzheimer), EA I (enfermos de alzheimer en etapa Inicial, EA F (enfermos de alzheimer en etapa Final), Las llamas blancas (Indican una placa senil), EC (corteza entorrinal), CA1 (hipocampo dorsal CA1), ITC (corteza temporal Inferior), SFC (corteza frontal superior); los colores en las columnas, del más oscuro al más claro indican el % de la pérdida de neuronas que va del 0-60%, (Morrison y Hoff, 1997).

El sistema monoaminérgico también se afecta al disminuir las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus sobre todo en la región rostral (patrón similar a la EA), las neuronas dopaminérgicas disminuyen un 6% por década en el núcleo caudado y el putamen, además también bajan los niveles de 5HT y sube el metabolismo de la serotonina, se sabe de igual forma que se reducen los receptores noradrenérgicos α -2 presinápticos en la corteza, núcleos basales e hipotálamo, (Gil y cols., 2000; Wu y cols., 2002).

I.3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA ocasiona *“Declive gradual de capacidades mentales como el razonamiento, la memoria, el juicio, y la personalidad”*, su diagnóstico en humanos se realiza a través de estudios neuropsicológicos como la batería ADAS-Cog entre otras, y clínicos de laboratorio, esta enfermedad se asocia a la *“presencia de una cantidad excesiva de placas neuríticas en la corteza cerebral, sistema límbico, y sustancia gris subcortical la cual contiene el péptido beta amiloide (β A) y ovillos (marañas) neurofibrilares formados por proteína tau hiperfosforilada”* (fig.10) (Alvin y cols., 2011; Crews y Masliah., 2010; Luna-Muñoz y cols., 2010; Mucke, 2009) aproximadamente afecta a un 6-15% de las personas mayores de 65 años de edad, y quizás al 40% de los que pasan de 80 años de edad, (Ramírez y cols., 2000).

La molécula proteica denominada beta amiloide (β A) se localiza a nivel extracelular (fig. 11), y procede del metabolismo de una proteína de mayor tamaño llamada proteína precursora de amiloide (APP), (DeKosky, 2002; Laferla y cols., 2007; Luebke y cols., 2010).

Los ovillos neurofibrilares se localizan a nivel intracelular y se caracterizan por la presencia de fibrillas anormales apareadas y dispuestas en hélice (filamentos helicoidales apareados, PHF), estos son responsables de la degeneración celular y, paradójicamente se componen de proteína TAU hiperfosforilada (fig.11), un componente normal del citoesqueleto neuronal (Crews y Masliah, 2010; Gendron y Petrucelli, 2009; Ramírez y cols., 2000).

En la actualidad se propone que los principales fenómenos moleculares que desencadenan la acumulación del amiloide β son, el desbalance entre sus niveles de

producción, agregación y depuración además, la formación de oligómeros de A β , quienes median el daño sináptico a través de la formación de poros con función parecida a la de un canal de membrana alterando los receptores a glutamato, hiperexcitando así la circuitería de este neurotransmisor causando daño y disfunción mitocondrial, alteración de los lisosomas y las vías de señalización plásticas de la neurogénesis (fig.11) (Fiala y cols., 2007; Mucke, 2009). Aunado a lo anterior también se consideran factores importantes el daño en la señalización de proteínas GSK3 β y en la CDK5, lo cual conduce a la neurodegeneración progresiva de la enfermedad (Crews y Masliah, 2010; Ubhi y cols., 2009).

Hay bastante información que señala también daño por hiperactivación de las células de la glía y de la astrogliá (fig.11), la microglía se observa reclutada tempranamente en los sitios donde hay depósitos de β A, se descubrió lo anterior gracias a las señales quimio tácticas del mismo β A, una vez que se activa la microglía asociada a la placa senil, se induce la expresión de marcadores inflamatorios como el complejo mayor de histocompatibilidad I y II (CMH-I-II), interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), proteínas de fase aguda y TNF α 50, receptores para quimioquinas (CCR3, CCR5), y agentes inflamatorios como C1qr (receptor para el C1 del C') (8,13) (García y cols., 2001).

En cultivos de microglía las concentraciones pico molares de APP estimulan la actividad del NF-kB, de ahí la expresión de IL-1 y óxido nítrico sintetasa (NOS) que produce grandes cantidades de de óxido nítrico y éste a su vez produce peroxinitritos altamente dañinos para la neurona, (García y cols., 2001).

La pérdida progresiva de memoria probablemente se debe a las alteraciones en los sistemas colinérgicos y monoaminérgicos que se van dañando irreversiblemente, se sabe por ejemplo que en las primeras fases de la enfermedad se detecta decremento en los niveles de transmisión de ACh en la corteza cerebral, y esto se relaciona directamente con el declive cognoscitivo progresivo que se presenta como parte de la sintomatología de la EA, pero también es un fenómeno que se presenta durante la etapa de envejecimiento, (Billard, 2006; Lamour y cols., 2004; Sarter y Parikh, 2005).

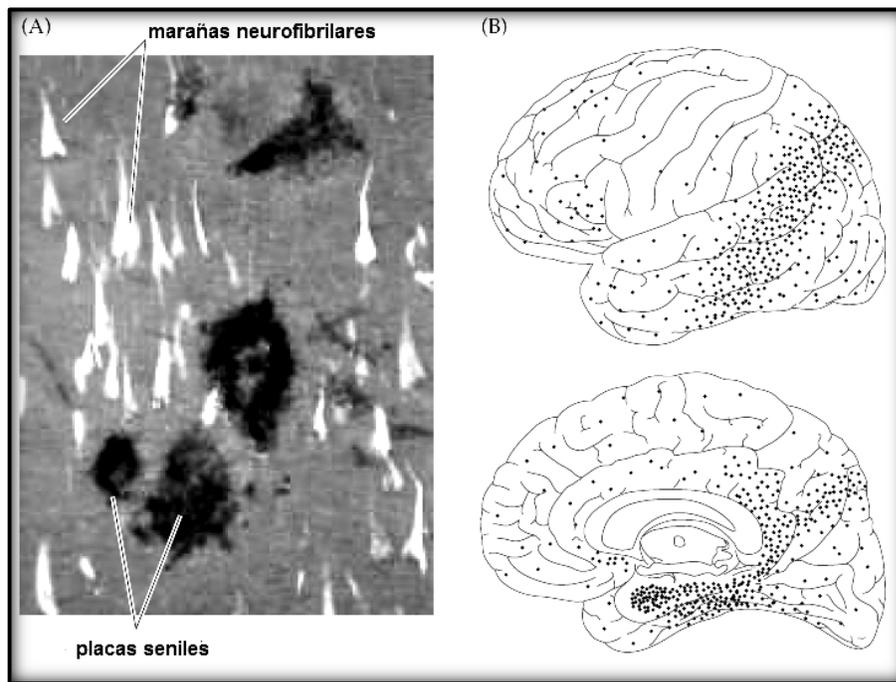


Fig. 10. En A observamos las marañas neurofibrilares (llamas blancas), y placas neuríticas (oscuro) que se acumulan en las zonas puntadas en B del encéfalo postmortem, en pacientes con demencia de Alzheimer (Purves y cols., 2004).

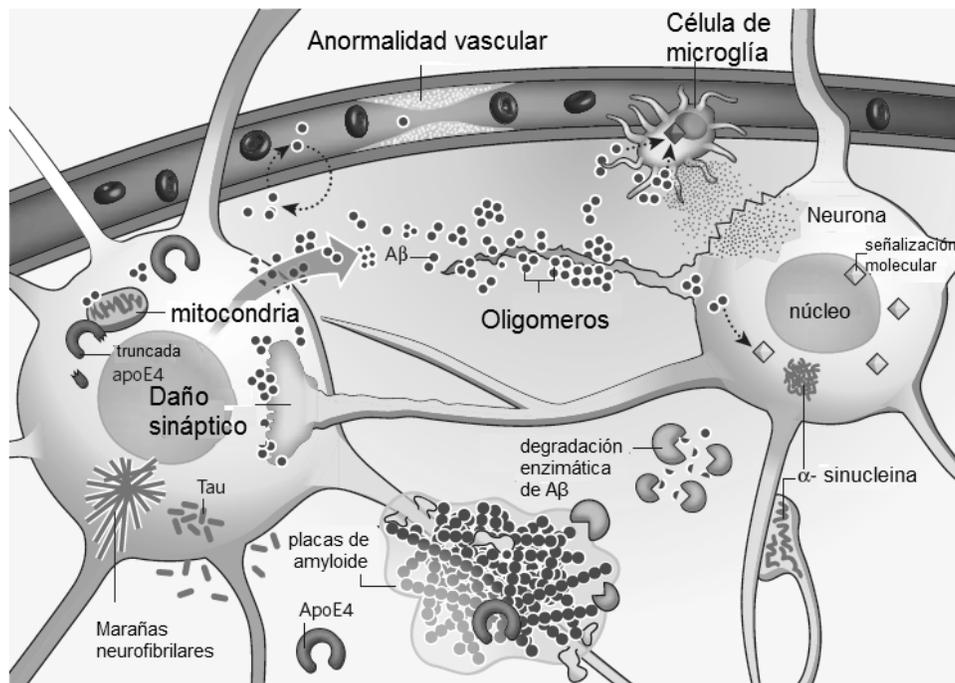


Fig. 11. En la imagen se representa la biología molecular de la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer, según la hipótesis actual, que sugiere la acumulación del βA como resultado del incremento en su producción, y decremento en su degradación enzimática., también puede acumularse por alteración en los procesos de transporte a través de la barrera hematoencefálica. Los oligómeros de βA , pueden afectar las sinapsis, mientras que las placas de amiloide deforman las neuronas., los βA oligómeros interactúan con la superficie membranal y sus receptores cambiando las cascadas de señalización, liberando mediadores neurotóxicos en lugar de la microglía. Las anomalías vasculares impiden la entrada de nutrientes,

aumenta la activación de astrocitos y microglía., además la apoE4 aumenta los niveles de β A disminuyendo su depuración y desestabilizando al citoesqueleto. De forma intracelular, el β A daña funciones mitocondriales, y las proteínas tau y sinucleína, pueden unirse formando oligómeros patógenos, y forman complejos intraneurales grandes, desplazando a organelos vitales intracelulares, (Mucke, 2009).

En las regiones dañadas del cerebro, la disfunción y la muerte de las neuronas se asocia con anomalías citoesqueléticas que reducen el nivel de proteínas sinápticas en las regiones del cerebro a donde van a parar estas neuronas (Jian y cols., 2004; Mattson, 2004; Terry y Buccafusco, 2003).

La disfunción del sistema glutamatérgico puede expresarse como un aumento o una disminución de su concentración en el medio extracelular, en el primer caso se produce una sobrestimulación, en el segundo hay un descenso de la actividad excitadora la cual a largo plazo, puede alterar la función normal del sistema nervioso en particular de algunos circuitos de la corteza cerebral y de sus proyecciones (Alvin y cols., 2011; Arendt, 2009; Rylett y Williams, 1994). También en este sentido se ha demostrado el papel del incremento en la actividad glutamatérgica en entidades de inicio agudo como la isquemia cerebral y de tipo crónico como en el Alzheimer; en un estudio in vivo realizado por González y cols en el 2003 evaluaron a la enzima antioxidante catalasa (CAT) así como a la del metabolismo oxidativo superóxido dismutasa (SOD), y descubrieron que existe estrés oxidativo como proceso neurodegenerativo que antecede a la EA, (Ansari y Scheff, 2010; González y cols., 2004).

I.4. CLORHIDRATO DE DONEPECILO (DON)

El DON es un inhibidor reversible de la enzima acetilcolinesterasa, conocido químicamente como: clorhidrato de (+)-2,3 dihidro-5-6-dimetoxi-2-[[1-(fenilmetil)4-piperidinil]-1H-inden-1-ona, su nombre comercial es ARICEPT, el compuesto tiene la siguiente fórmula empírica: $C_{24}H_{29}NO_3HCl$. Ni los alimentos, ni la hora de administración (dosis matutina o vespertina) influyen en la tasa o magnitud de absorción. La vida media de eliminación del Donepecilo es de casi 70 hrs, después de la administración de dosis múltiples, alcanza el estado estable en no más de 15 días, se une en 96% a las proteínas plasmáticas humanas, (Cacabelos, 2007).

Es una droga sintomática que no modifica los procesos neurodegenerativos, pero mejora las funciones cognitivas, está indicado como auxiliar para el tratamiento de la

enfermedad leve a moderada del tipo de Alzheimer (Kume y cols., 2005; Leonard, 2004; López-Pousa y cols., 2001), *“los estudios sugieren que el donepecilo ejerce su efecto terapéutico al mantener estable la función colinérgica en el sistema nervioso central”* esto se logra aumentando la concentración de ACh en la hendidura sináptica, mediante la inhibición reversible de su hidrólisis por acetilcolinesterasa, una de las enzimas que la hidrolizan, (Howard y cols., 2007; López-Pousa y cols., 2010; Mueller y cols., 2006).

Son numerosos los reportes clínicos, en los cuales se han aplicado pruebas neuropsicológicas válidas para evaluar y determinar los cambios en la función cognitiva de pacientes con EA, entre las pruebas más usadas está la batería ADAS-Cog que evalúa praxis, memoria, lenguaje, orientación y razonamiento; al evaluarse a los enfermos tras la aplicación de terapia con donepecilo mostraron un deterioro cognitivo global significativamente menor en comparación con pacientes no diagnosticados con EA, la eficacia clínica observada incluso a lo largo de un año se centró principalmente en las áreas de memoria, aprendizaje, así como lenguaje expresivo, (Csernansky y cols., 2005; Lanctot y Herrmann, 2004; López-Pousa y cols., 2001; Shigeta y Homa, 2001).

En otro estudio, se trabajó con un grupo aleatorizado de 67 pacientes con EA leve a moderada, recibieron placebo o donepecilo (5 mg/día) durante 24 semanas, tras la valoración inicial de los pacientes, se llevaron a cabo nuevos controles cada 6 semanas, en los que se valoró su puntuación con la prueba ADAS-Cog (Subescala Cognitiva de Alzheimer), se midió la concentración cerebral de N-acetilaspártato y se realizó RMN (resonancia magnética) para medir los volúmenes hipocámpicos derecho e izquierdo, sus resultados fueron los siguientes: los niveles de N-acetilaspártato resultaron más elevados al principio del tratamiento en los pacientes del grupo con donepecilo, pero al final la diferencia con los de placebo ya no fue significativa; esto coincide con lo que solemos ver en la práctica, en la que normalmente se produce una mejoría del paciente durante los 3 primeros meses del tratamiento con donepecilo, para posteriormente progresar de nuevo la enfermedad; en cuanto a la puntuación obtenida con la ADAS-Cog el grupo con DON frente a los controles mostró mejoría en los resultados obtenidos, así mismo en cuanto a los volúmenes totales del hipocampo, hubo menor regresión del tamaño para el grupo con donepecilo frente a los placebo, no así en el hipocampo

izquierdo, dónde sólo hubo tendencia a la reducción del volumen, (Hashimoto y cols., 2005; Ranga y cols., 2003).

El ratones transgénicos Tg2576 (modelo que acumula β A en áreas involucradas en procesos de memoria y aprendizaje) que desarrollan déficit de memoria espacial, después de tratarlos con DON mostraron retardo en la formación de placas neuríticas comparadas con el grupo control, además de mejorar los déficits de “memoria espacial”, (Hongxin y cols., 2005).

El tratamiento con DON aplicado durante 28 días para otro modelo de EA en ratón, aumentó la expresión de la enzima AChE (niveles de RNAm), así como su actividad en el SNC, (Zivin y Pregel., 2008). Se sabe actualmente que, el donepecilo no solamente es usado para tratar EA sino también mejora la sintomatología cognitiva en enfermedades como esquizofrenia (Csernansky y cols., 2005; Ferreri y cols., 2006), la de los cuerpos de Lewy, o la del mal de Parkinson (Chung y cols., 2010), se propone que en estas enfermedades actúa bajo el mismo mecanismo inhibidor de la AChE, sin embargo esto aún no es claro.

Hace ya algunos años que se comenzó a especular sobre un posible efecto neuroprotector del DON ante daño neuronal en modelos in vitro (Akasofu y cols., 2003; Takada-Takatori y cols., 2003), pero es en los últimos dos años que se han acumulado más evidencias acerca de este posible mecanismo de acción independientemente de su acción inhibidora, ya se tienen reportes de que DON impide los efectos apoptóticos en cultivos neuronales tratados con excitotoxicidad por glutamato, (Shen y cols., 2010; Scernansky y cols., 2005).

Se llevo a cabo un estudio en el que se trabajó con cultivos celulares de neuronas de rata, tratados previamente con dosis crónicas de donepecilo, para después exponerlos a dosis agudas de glutamato, observaron que el DON protege a las neuronas del efecto tóxico del glutamato, y concluyen en que el mecanismo de acción puede involucrar vías de señalización de los nAChcR-PI3k y MAPk de esta manera explicaron la sobrevivencia celular debido a éste fármaco, (Akasofu y cols., 2006; Kotani y cols., 2008; Takada-Takatori y cols., 2008; Scernansky y cols., 2005).

El hecho de que DON tenga efectos positivos en contra de la apoptosis celular inducida en cultivos neuronales, muestra una nueva visión sobre un posible mecanismo

neuroprotector del fármaco, basado principalmente en la posible estimulación que ejerce el donepecilo sobre los receptores nicotínicos (fig.12), (De Bartolo y cols., 2009; Shen y cols., 2010; Takada-Takatori y cols, 2009).

En otro modelo de daño neuronal in vitro, el tratamiento con este fármaco promueve la disminución de la muerte celular, y propusieron que probablemente es mediante la modulación de GSK-3 que DON impide la neurotoxicidad y apoptosis (Noh y cols., 2009).

Por otra parte en un estudio realizado por Benazi y cols., en 1999 trataron a pacientes diagnosticados con EA con un tratamiento combinado de donepecilo y verapamil (un antidepresivo), con el fin de tratar tanto los síntomas cognitivos como la depresión, ellos no obtuvieron mejoría en los pacientes tratados con este tratamiento, sino todo lo contrario, aumentaron de forma espontánea procesos maníacos y/o hipomaniacos como agitación, depresión, humor eufórico, insomnio, fuga de ideas, desorientación, paranoia y agresividad.

Nuestro grupo de trabajo también encontró cambios morfológicos tras el tratamiento con donepecilo en ratas de 10 y 12 meses de edad, en las cuales aumentó la densidad de las espinas distales en la corteza, hipocampo, y el NAcc, la arborización aumentó sólo en el hipocampo dorsal y no en las demás áreas (Alcántara y cols., 2010).

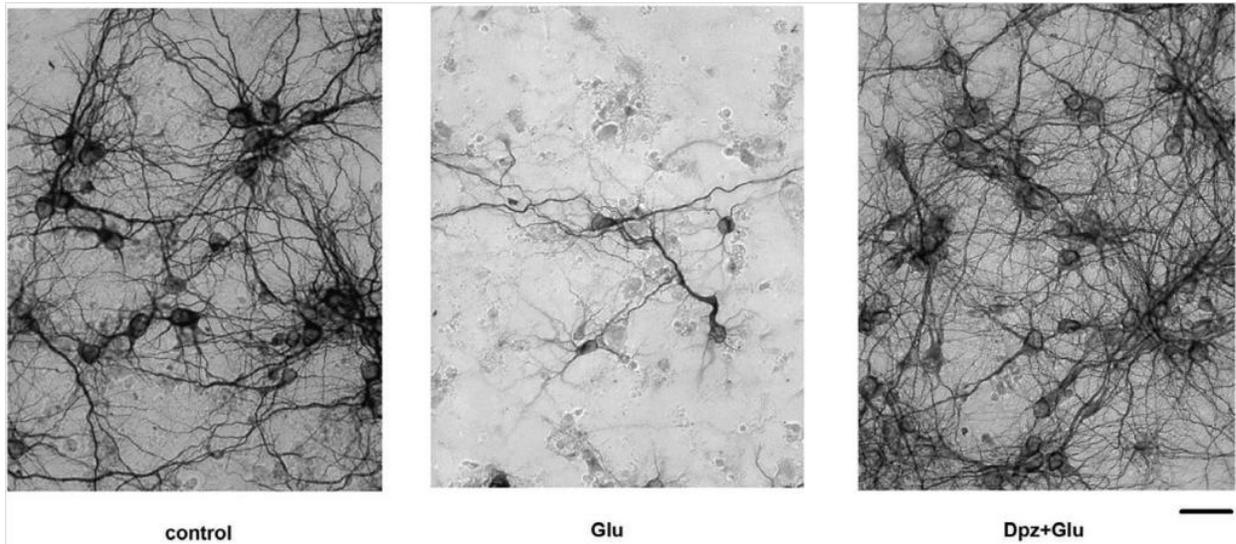


Fig. 12. Imágenes obtenidas a través de inmunotinción, que muestran el efecto protector del tratamiento con donepecilo (Dpz+Glu en la tercera imagen) en contra de la excitotoxicidad inducida por glutamato (Glu, segunda imagen), en cultivo de tejido neuronal (Shen y cols., 2010).

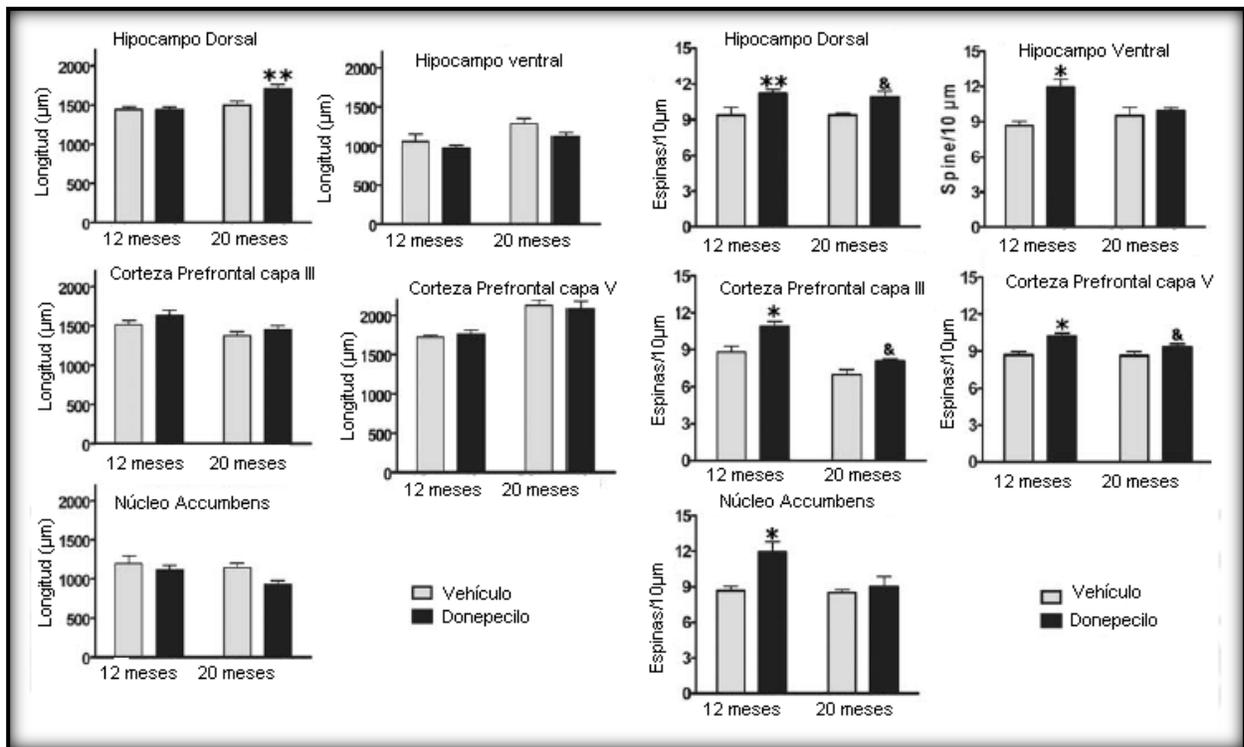


Fig. 13. En las gráficas de la izquierda, se presentan los resultados de la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo, corteza prefrontal, y el núcleo accumbens; se obtuvo una mayor densidad de espinas (ANOVA de una vía, con $P < 0.0001$), para los grupos tratados con donepecilo. En las gráficas del lado derecho, se presentan los resultados de analizar la longitud total dendrítica (en las mismas áreas), en las cuales, hubo mayor longitud alcanzada por el grupo tratado con donepecilo para el hipocampo dorsal (con una $P < 0.0001$), en ratas de 20 meses, (Alcántara y cols., 2010).

I.5. FACTORES NEUROTRÓFICOS

Un factor neurotrófico es una biomolécula producida de forma endógena por los tejidos de inervación de las propias neuronas, o por células presentes en el entorno de las mismas es decir, células de la glía. En ausencia de factores tróficos las neuronas degeneran y mueren, son importantes para proveer neuroprotección, entendiéndose ésta última como el conjunto de mecanismos encaminados a asegurar el funcionamiento adecuado del sistema nervioso (SN), como respuesta a una situación adversa, (Moris y Vega., 2003). Los factores neurotróficos modulan la plasticidad funcional del SNC, a nivel anatómico y funcional, llevan a cabo el mantenimiento integral potenciando los recursos celulares y además sostienen las conectividades neuronales adecuadas, (Moris y Vega., 2003).

El termino “plasticidad cerebral” (procede de la palabra plástico, significa moldearse o cambiar) en la actualidad está de moda en el ámbito de las neurociencias, pues todo aquello que se relacione con la capacidad de recuperación y regeneración de neuronas, se traduce en plasticidad, los factores tróficos activan las vías de señalización para procesos de plasticidad, y están presentes durante el desarrollo regulando la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de todos los tipos neuronales del SN, de igual forma están presentes en la etapa adulta ya que son necesarios para mantener funcionales las células maduras (Mattson y Wan, 2008; Gómez-Pinilla, 2008; Beck y Yaari, 2008; Arias-Carrión y cols., 2007; Portera-Sánchez, 2002).

Los patrones de conectividad que están en constante redefinición, requieren y dependen del aporte trófico en el periodo adulto. Se tiene reportado por ejemplo que, en la enfermedad del Parkinson, entender los procesos apoptóticos de las neuronas dopaminérgicas, conduce a entender los mecanismos por los que se podrían evitar algunos procesos específicos como la disfunción mitocondrial: defectos en el complejo mitocondrial contribuyen a la degeneración neuronal porque disminuye la síntesis del adenosín trifosfato (ATP), (Pedroso y cols., 2008), también el estrés oxidativo es un factor apoptótico en enfermedad de Parkinson, porque las neuronas dependen de la energía producida en las mitocondrias, y altos niveles de especies reactivas al oxígeno (producto del estrés) promueven el incremento de radicales libres que conducen la apoptosis celular.

La disminución o aumento en el aporte trófico modifica el tipo y número de espinas sinápticas (afecta la plasticidad) (figuras 7 y 8), y como mencioné anteriormente, en ratas que se someten a un ambiente enriquecido difieren en el mantenimiento de las neuronas en animales jóvenes y viejos (fig. 6).

Algunos ejemplos de factores que tienen efecto trófico en el sistema nervioso se enlistan en la figura 14 (Moris y Vega, 2003).

Familias de factores que tienen efecto trófico en el SN	
1. NT	c. PSP
a. NGF	d. ART
b. BDNF	6. FGF
c. NT-3	a. aFGF
d. NT-4	b. bFGF
e. NT-6	7. EGF
f. NT-7	8. Neuroregulinas/GGF
2. CNTF/LIF	a. GGF-1
a. CNTF	b. GGF-2
b. LIF	c. GGF-3
c. CT-1	9. Interleukinas
d. CLC	a. Interleukina-6
3. HGF/SF	10. Neuroinmunofilinas
4. IGF	a. Ciclofilina
a. Insulina	b. FKBP
b. IGF-1	11. PDGF
c. IGF-2	12. PROTEÍNA S-100
5. Familia GDNF	13. TGF- β
a. GDNF	14. VEGF
b. NTN	

ART = artemina, BDNF = factor de crecimiento derivado del cerebro, CLC = cardiotrofina-1-like cytokina, CNTF = factor neurotrófico ciliar, CT-1 = cardiotrofina-1, EGF = factor de crecimiento epidémico, FGF = factor de crecimiento fibroblástico, FKBP = proteínas de unión al FK506, GDNF = factor neurotrófico derivado de una línea celular glial, GGF = factor de crecimiento glial, HGF/SF = factor de crecimiento del hepatocito/factor scatter, IGF = factores de crecimiento insulina-like, LIF = factor inhibidor de la leucemia, NGF = factor de crecimiento nervioso, NT-3 = neurotrofina-3, NT-4/5 = neurotrofina-4/5, NT-6 = neurotrofina-6, NT-7 = neurotrofina-7, NTN = neurturina, PDGF = factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PSP = persefina, TGF- β = factor- β de crecimiento tumoral, VEGF = factor de crecimiento vascular endotelial.

Fig.14. En este cuadro se enlistan las familias de factores que tienen efecto trófico sobre el SN, el grupo de las neurotrofinas tiene acción sobre todo en el SNC (Moris y Vega., 2003).

Las neurotrofinas (NGF, BDNF, y NT 3-5) son los principales factores tróficos del SNC, su mecanismo de acción consiste en su unión a receptores tipo trK para formar dímeros con

o sin el receptor de baja afinidad p75, éste último relacionado con el proceso de apoptosis. Al regular el equilibrio entre la supervivencia y la inducción de muerte, contribuyen en la determinación del número de neuronas y las sinapsis formadas en una estructura determinada. El NGF tiene alta afinidad con el receptor trkA, el BDNF y las NT 4-5 tienen afinidad alta con trkB, y la NT-3 por trkC. La unión de las neurotrofinas maduras con sus receptores produce la activación de cascadas de señalización intracelulares que culminan con la promoción de la supervivencia, el bloqueo o inducción de la apoptosis, y la diferenciación celular en el SNC y en el SNP, tanto en el desarrollo como en la madurez (Luna-Muñoz y cols., 2010)

I.6. CEREBROLISINA (CBL)

La cerebrolisina (CBL) es una mezcla de péptidos derivados por degradación enzimática del cerebro de cerdo; ésta mezcla consiste en: un 25% de péptidos con un peso molecular < 10 KD y un 75% de aminoácidos libres; atraviesa la barrera hematoencefálica fácilmente, mejorando las capacidades de atención y memoria, (Hartbauer y cols., 2001; Ladurner y cols., 2005; Riley y cols., 2006). Se administra por vía intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), y actualmente vía oral, se ha utilizado desde hace 40 años como una terapia alternativa en pacientes con daño neurodegenerativo como la esclerosis múltiple, demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, en niños con autismo, y en pacientes que han sufrido infarto cerebral agudo, en donde se observó mejoría de las funciones cognitivas en la mayoría de los casos tratados con este fármaco, (Ladurner y cols., 2005).

Se propone en la actualidad que, los efectos terapéuticos de la CBL son los siguientes: 1.- reactividad neuronal, 2.- neurotrofismo, 3.- neurogénesis, 4.- efecto anti-amiloidogénico (sobre la acumulación del β A, y 5.- efecto anti-neurofibrilar (sobre las marañas neurofibrilares), (Luna-Muñoz y cols., 2010). Su mecanismo de acción propuesto es similar a la de los factores neurotróficos endógenos (fig.15), como el NGF o el BDNF, sin embargo. Aún no se ha dilucidado concretamente.

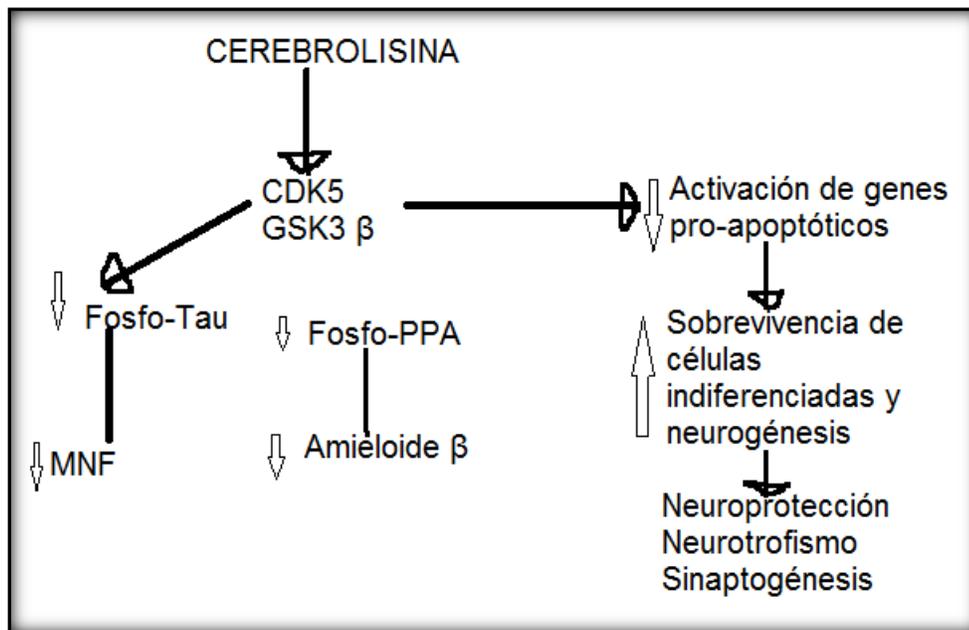


Fig. 15. Mecanismo de acción propuesto para la cerebrolisina, en la figura se observan las acciones de la CBL sobre la CDK5 que regula los estados de fosforilación tanto de la proteína tau, como de la proteína precursora del amiloide β (PPA), (Luna-Muñoz y cols., 2010).

En niños con autismo se ha utilizado una terapia con cerebrolisina, en donde se observó mejoría de los síntomas en esta enfermedad sobre el 89% de los niños tratados; el fármaco fue aplicado i.m cada tercer día, en cada aplicación se les administró 1 ml de cerebrolisina, el tratamiento tuvo una duración de 1 año con intervalos de 2 meses, (Radzivil y Bashina., 2006). También hay reportes indicando que esta droga puede degradar al precursor de la proteína β A en ratón transgénico para la EA; impidiendo así la formación de los depósitos intracelulares del amiloide β , (Rockenstein y cols., 2007). A este respecto, Tesseur y cols., en el año 2006, concluyen que CBL aumenta la señalización del factor de crecimiento transformante beta (GF- β), lo cual reduce la neurodegeneración en cultivos celulares, (Tesseur y cols., 2006).

Según Álvarez y cols en el 2006, la administración intravenosa de 10-30ml de CBL, cinco veces por semana durante un mes, en pacientes con Alzheimer, induce actividad neurotrófica vista por la mejoría de las funciones cognitivas en los pacientes. Patockova y cols en el 2003, realizaron un estudio en el que indujeron estrés oxidativo en ratones, después sometieron a los animales a inyecciones subcutáneas con cerebrolisina en dosis de 6.0 IU/kg, el estrés aumentó considerablemente la peroxidación de lípidos membranales, por ende aumentó el contenido de radicales libres, y al tratar éstos ratones

con CBL disminuyeron los niveles de TBARs (marcadores de la lipoperoxidación de lípidos) en el tejido cerebral y en el corazón, de acuerdo a lo anterior, CBL también reduce el efecto apoptótico celular mediante la disminución de los radicales libres en tejido cerebral, (Patočkova y cols., 2003).

Ya son numerosas las contribuciones al efecto benéfico de la administración de CBL, en el 2008 se realizó un estudio en el que se administró CBL a ratones hembras Mecp2^{308/y} de 4 meses de edad (un modelo del síndrome de Rett en ratón) y concluyeron que, CBL mejora la patología dendrítica y la pérdida neuronal en el hipocampo y corteza cerebral, éste estudio sugiere que la CBL tiene efectos neurotróficos benéficos (Doppler y cols., 2008).

De igual forma, se han realizado estudios en pacientes con insuficiencia vascular, resultando menos severos los síntomas de atención y memoria tras el tratamiento con la CBL, estos resultados están soportados por estudios electrofisiológicos, (Damulin y cols., 2008). En pacientes diagnosticados con alzheimer y tratados con CBL, se evaluaron los signos cognitivos aplicando las pruebas psicológicas conductuales ADAS-cog y la CIBIC; los resultados sugirieron una buena tolerancia al fármaco por parte de los pacientes, además de que mejoraron los síntomas cognoscitivos deteriorados, (Panisset y cols., 2001).

En 2009 se diseñó un modelo de neurodegeneración de tipo EA nombrado: “neuropatología fibrilar” se llevó a cabo en ratón transgénico Thy1-APP (ratón transgénico que desarrolla proteína precursora del β A), al cual se le indujo “alteración neurofibrilar” mediante la transferencia viral de un gene con un mutante para la hiperfosforilación y acumulación de la proteína TAU (mutTAU P301L), este ratón transgénico recibió inyecciones bilaterales de AAV2-mtu TAU o AAV2-GFP (con el virus sin mutación) en el hipocampo, y al cabo de tres meses, los compararon con su control (non-Tg), éstos ratones, desarrollaron además del β amiloide, las marañas neurofibrilares (típicos de la EA); se aplicó un tratamiento de CBL en dicho ratón (ahora identificado como: AAV2-mutTAU/APPtg), durante 3 meses por vía i.p, y se observó que, el tratamiento redujo la neurodegeneración celular y la patología de la fosforilación anormal (en TAU), proceso que requiere la señalización celular de CDK5 y GSK3 (Ubhi y cols., 2009).

En el 2010, Plosker y Gauthier probaron un protocolo clínico que consistió en aplicar un tratamiento combinado de DON+CBL, a pacientes diagnosticados con la EA (fig.16), el tratamiento duró 28 semanas, durante el cual se evaluó el desempeño cognitivo de los pacientes cuatro veces: a las 4, 12, 16 y 28 semanas de tratamiento; aplicando la prueba conductual “ADASC-Cog”. Tras los resultados en la mejoría del desempeño cognitivo, se sugiere que la combinación de ámbos pudo haber causado un efecto farmacológico aditivo de la combinación (Plosker y Gauthier., 2009). Álvarez y cols., 2011 llegaron a la misma conclusión en éste año (fig.16), sugiriendo un posible efecto potenciador de la combinación de CBL+DON en pacientes diagnosticados con EA, sin embargo, aún no hay estudios fisiológicos, moleculares o bien citoarquitectónicos que apoyen tal hipótesis.

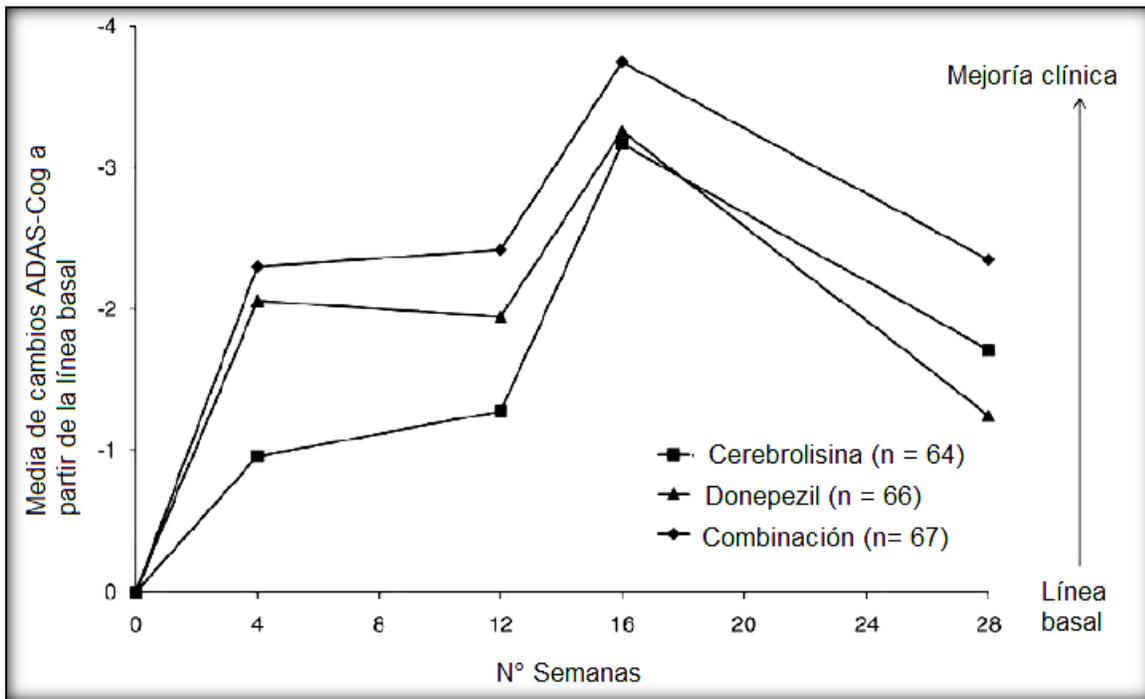


Fig.16. Gráfica que muestra las calificaciones obtenidas al evaluar la sintomatología cognitiva en pacientes con EA, a través de la prueba de ADAS-Cog; posterior al tratamiento con donepezilo, cerebrolisina, y la combinación de ambos. Se obtuvieron mejores calificaciones (en el desempeño cognitivo), para el grupo de pacientes tratados con la combinación de ambas drogas frente a los tratados con las drogas por separado, (Álvarez y cols., 2011; Plosker y Gauthier., 2009).

I.7. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA NEURONAL

Las espinas dendríticas son estructuras que amplían el espectro sináptico de las neuronas, y se ha descubierto que estas estructuras cuentan con una alta capacidad de remodelación y consecuente formación de nuevas sinapsis, que sin duda son funciones

importantes para la eficiencia de la memoria. En una investigación sobre células piramidales, llamaron “integración sináptica” a un conjunto de sinapsis que realizan cierta función que puede durar un determinado tiempo y que depende de los dominios dendríticos y sus correspondientes blancos sinápticos, se busca encontrar alguna regla fisiológica de éste tipo, que pueda ser detectada, para así empezar a comprender la maleabilidad de las dendritas y sus espinas, (Sprutson, 2008), todo esto es bastante complejo de estudiar, sobre todo si tomamos en cuenta que son las variables ambientales tanto externas como internas, las que determinan la remodelación de las sinapsis, resulta un hito en la investigación saber y descubrir que la plasticidad sináptica es susceptible a cambios del medio ambiente, incluso en animales adultos; y más interesante es, saber que las características morfológicas de las dendritas neurales y sus espinas son un reflejo del estado funcional en el que se encuentran, (Kolb y cols., 1998).

En modelos de ratón para EA se ha observado pérdida y alteración de espinas dendríticas provocados por la acumulación de placas β A en áreas vitales para la consolidación de la memoria como el hipocampo y la corteza prefrontal, (Knobloch y Mansuy., 2008). De igual forma Yin y cols., 2008, al realizar un estudio con ratones transgénicos como modelo de Alzheimer, y a través de la interacción de estructuras β A con las neuronas monoaminérgicas; observaron pérdida celular de las mismas, además de que ocurrió incluso en estadios tempranos de la enfermedad, también concluyeron que, existe degeneración axonal asociada a la atrofia de cuerpos neurales.

Todos los cambios plásticos que pueda sufrir una neurona a lo largo de su vida, son resultado de cambios intrínsecos de organelos celulares y el material genético de la misma para responder a los cambios medioambientales externos e internos, la disfunción de estos organelos es inevitable si la homeóstasis no es óptima, por ejemplo las mitocondrias pueden sufrir procesos de oxidación que causan neurodegeneración y la posterior alteración en la función y morfología neuronales (Knott y cols., 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento combinado de donepecilo más cerebrolisina, administrado a pacientes con EA, es más eficaz que aplicando los fármacos por separado (Álvarez y cols., 2011; Plosker y Gauthier., 2009), ya que mejora los valores de la prueba neuropsicológica ADASC-Cog en los enfermos; sin embargo, no hay estudios neuromorfológicos y moleculares que expliquen tal mecanismo de acción; por lo tanto, es interesante además de necesario, investigar de qué manera estaría actuando la combinación de ambos fármacos y promover tal efecto.

En el presente trabajo, analizamos la arborización y la densidad dendrítica de neuronas piramidales, así como de las espinosas medianas, dos de los tipos neuronales que participan activamente en funciones cognitivas superiores y conductuales (Sprutson, 2008), las piramidales las encontramos en regiones prefrontales de la corteza (capas III y V), en el hipocampo dorsal y ventral, también en la amígdala, y las neuronas espinosas medianas en el centro y la corteza del núcleo accumbens. Por otra parte, si el envejecimiento es un factor que predispone a la EA, entonces es necesario ampliar la investigación científica con el objetivo de aclarar las diferencias fisiológicas de lo que puede ser el envejecimiento “normal” de otro que genera patología neurofibrilar, y luego EA.

Sabemos también que tanto el donepecilo, como la cerebrolisina, se utilizan en padecimientos neurodegenerativos como: enfermedad de Alzheimer, Parkinson, isquemia cerebral, y lesión cerebral (entre otros), la CBL actúa como un conjunto de factores tróficos que promueven la neurogénesis principalmente en el hipocampo (Ubhi y cols., 2009), incluso se usa en padecimientos cardiovasculares y cáncer. Por su parte (como también lo hemos mencionado), el DON activa la función del sistema colinérgico para mantener las conexiones neuronales cognitivas en las áreas prefrontales y contribuir a enlentecer la sintomatología cognitiva en los enfermos con EA.

Es indispensable el estudio de los efectos citiarquitectónicos en el SNC que resultan del tratamiento combinado de donepecilo y cerebrolisina, ya que no son suficientes los de tipo clínico, podemos así contribuir a desentrañar parte de los mecanismos celulares aún desconocidos, que originaron la mejoría de la escala cognitiva ADAS-Cog obtenida en los pacientes tratados con la combinación de ambos fármacos (Álvarez y cols., 2011; Plosker y Gauthier, 2009), ya que hasta el momento, la EA es incurable, y los tratamientos que se

aplican pueden mejorar de forma temporal la calidad de vida de los enfermos, más no a su curación.

III.HIPÓTESIS

La administración intraperitoneal durante nueve semanas de la combinación donepecilo más cerebrolisina en ratones de siete meses, tendrá efecto farmacológico aditivo, observado por el aumento en la actividad motora, mayor arborización y longitud dendrítica, así como mayor densidad de espinas, en neuronas de la corteza cerebral, hipocampo, giro dentado, núcleo accumbens, y amígdala.

IV.OBJETIVOS

IV.1. GENERAL

Analizar el efecto de la administración durante nueve semanas, de donepecilo, cerebrolisina, y de la combinación de ambos (donepecilo más cerebrolisina), en la actividad motora y la neuromorfología de la corteza cerebral, hipocampo, giro dentado, núcleo accumbens, y amígdala en ratones de siete meses.

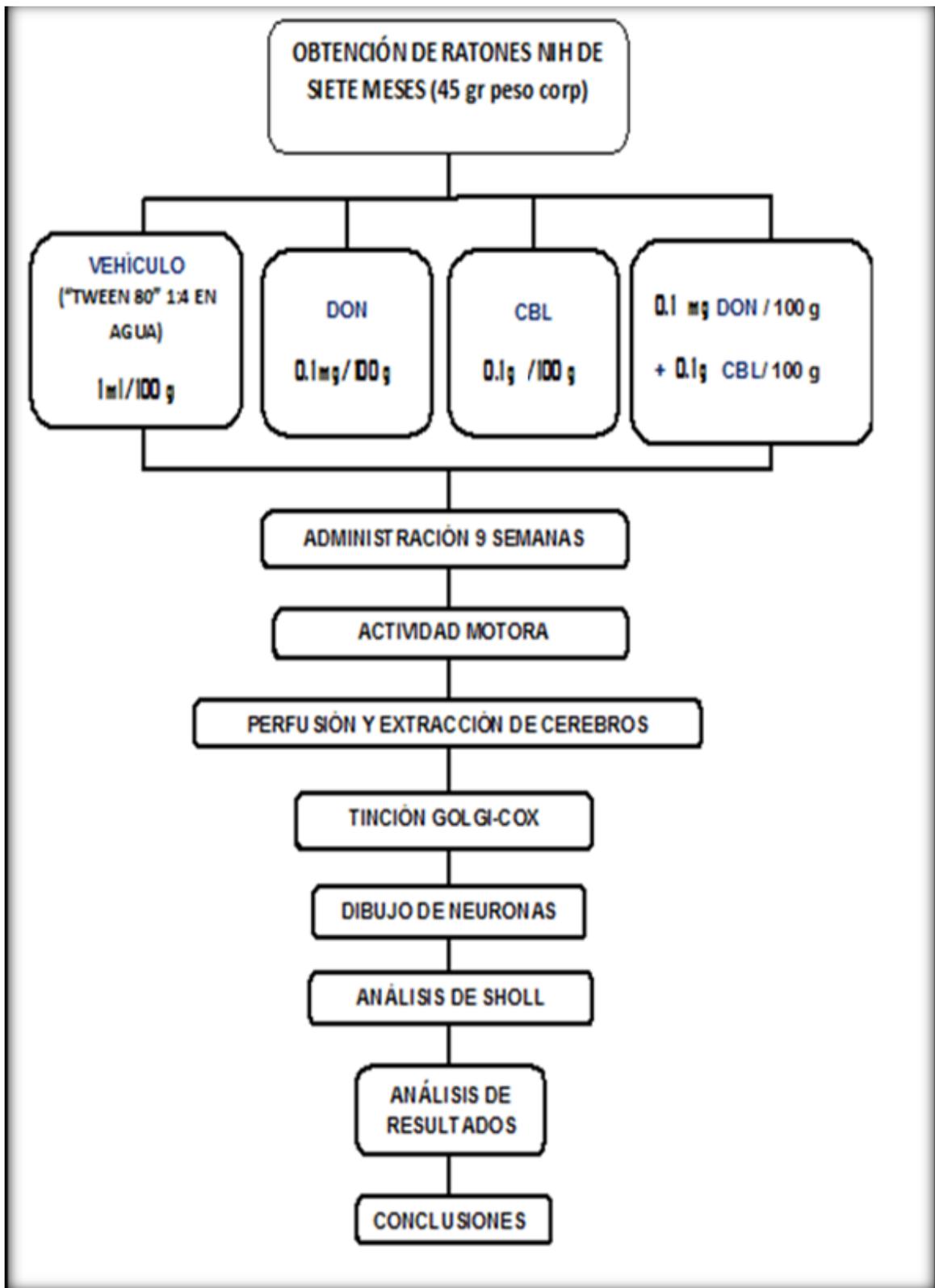
IV.2. PARTICULARES

1. Determinar cambios conductuales a través de la aplicación de la prueba de “actividad motora en ambiente nuevo y campo cerrado”, después de la administración de donepecilo más cerebrolisina.
2. Determinar cambios en la arborización, longitud total, orden mayor alcanzado y densidad de espinas dendríticas; después de la administración de donepecilo más cerebrolisina, aplicando las técnicas de tinción “Golgi-Cox”, y la del “análisis de Sholl”, en: neuronas piramidales de la CmPF III, CmPF V, ABL, HD CA1, VH CA1, neuronas granulosas del GD, y neuronas espinosas medianas del centro y la corteza del Nacc.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron ratones de 7 meses de edad (con un peso corporal de 45 g), de la cepa NIH, se obtuvieron del bioterio "Claude Bernad" de la BUAP, los cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad controladas (18-23°C y 50-60% de humedad respectivamente), con ciclos de luz oscuridad de 12 horas, prendiéndose las luces a las 8 horas. Se mantuvieron en cajas de acrílico transparente de 50X35X18 cm, en camas de viruta estéril beta chip^{MR}. Los ratones tuvieron libre acceso a alimento (Lab Diet MR número 5008) y agua. Se clasificaron en 4 grupos experimentales de 8 miembros cada uno, y cada grupo se subdividió para sólo colocar 5 ratones como máximo en cada caja. Se marcaron sus áreas terminales de la cola con plumón indeleble, para identificar cada grupo experimental. Los grupos experimentales fueron los siguientes: un grupo control administrado con solución vehículo VEH (combinación de Tween 80+agua, proporción 1:4 respectivamente y administrada 1 ml/100 g de peso corporal), un grupo cerebrolisina CBL administrado con 0.1 g/100 g de peso, un grupo donepecilo DON administrado con 0.1 mg/100 g de peso, y el tercer grupo CBL+DON en las mismas dosis y sustancias que los grupos anteriores respectivos. La administración i.p. se realizó durante nueve semanas cada día, entre un horario de 8-12 hrs de la mañana; posteriormente se realizó la prueba conductual de "actividad motora en ambiente nuevo y campo cerrado".

V.1. DIAGRAMA DE TRABAJO (Fig. 17)



V.2. PRUEBA DE “ACTIVIDAD MOTORA EN AMBIENTE NUEVO Y CAMPO CERRADO”

Consistió en lo siguiente: los ratones permanecieron en el área de la prueba durante 30 minutos, este tiempo permitió la adaptación al laboratorio. Esta prueba se realizó a la misma hora, y bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura. Los ratones se colocaron en cajas de acrílico de 44 cm de largo por 22 cm de ancho y 22 cm de altura, estas cajas tienen instalados 8 pares de fotodiodos en las paredes laterales, de tal forma que el movimiento de las extremidades del ratón, interrumpe la trayectoria de un haz de luz infrarroja imperceptible para él; registrando dicha interrupción como un movimiento, el registro se lleva a cabo por medio de un contador electrónico computarizado, que permitió registrar el número de movimientos de los animales en seis intervalos sucesivos de diez minutos cada uno, de modo que el registro de la actividad motora tuvo duración de una hora (Fig. 17), (Flores y cols., 1996). Al finalizar la prueba, se tomó nota del número de movimientos por ciclo de cada animal, para someterlos a la prueba estadística de ANOVA de dos vías, en el programa Graph Pad 4.0.

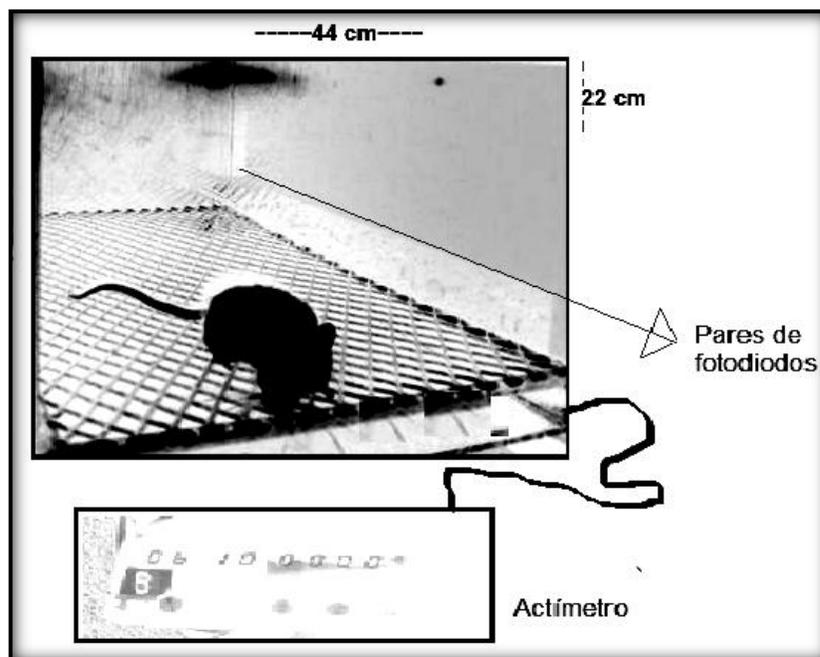


Fig.18. Caja de actividad motora conectada a un actímetro, la caja tiene dimensiones de 44 cm de ancho por 22 cm de altura, en los laterales tiene pares de fotodiodos infrarrojos, los cuales detectan los movimientos del animal; el actímetro contabiliza el número de movimientos en el tiempo, se programa previamente para que guarde los datos durante el tiempo que dure la prueba.

V.3. TINCIÓN DE GOLGI-COX

Al término de la prueba de actividad motora, se prosiguió a anestesiarse cada ratón con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso corporal i.p.), el paso siguiente fue hacer una perfusión intracardiaca, en la que se realizó una abertura de piel y músculo para exponer el corazón; y en el ventrículo izquierdo se hizo la perfusión de los animales, con aproximadamente 120 ml de solución salina (0.9%) por cada animal, y remover así los eritrocitos. Posteriormente, se removieron los cerebros y se sumergieron en solución de Golgi-Cox previamente preparada como se ha descrito con anterioridad (Flores y cols., 2005). Los cerebros fueron almacenados en la oscuridad por 14 días, durante los cuales la solución de Golgi-Cox se decantó y se cambió al tercer día y posterior a los 14 días, se reemplazó por solución de sacarosa al 30%, en la cual los cerebros permanecieron por 3 días antes de realizar los cortes histológicos. Se prosiguió a hacer los cortes histológicos del hipocampo, corteza media prefrontal, núcleo accumbens, y amígdala con ayuda de un vibro tomo manual motorizado (Camden Instrument MA752). Las rebanadas de cerebro fueron de 200 μm de espesor. El tejido en rebanadas se montó en laminillas previamente gelatinizadas (gelatina al 2%) y se mantuvieron en cámara húmeda. Una vez obtenido el tejido se realizó el proceso de revelado, (Gibb y Kolb., 1998). Bajo las siguientes indicaciones:

(Todo el procedimiento se realizó en total oscuridad).

- 1.- *Inicialmente se hizo un lavado en agua destilada durante un minuto.*
- 2.- *Se mantuvieron durante 30 minutos sumergidas las laminillas en hidróxido de amonio.*
- 3.- *Se realizó un lavado con agua destilada durante un minuto.*
- 4.- *A continuación se introdujeron durante 30 minutos en fijador rápido de Kodak para película fotográfica. Se utilizó su dilución 1:2 con agua destilada.*
- 5.- *Se lavaron con agua destilada durante un minuto.*
- 6.- *Se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol:*
 - 1 minuto con alcohol al 70 %
 - 1 minuto con alcohol al 95 %
 - 5 minutos con alcohol al 100 %
 - 5 minutos con alcohol al 100 %
 - 15 minutos con xileno.

Posteriormente se montaron y fijaron los cubreobjetos con resina sintética (sintética al 60% en Xilol, marca Hycel) sobre los cortes ya revelados y cubiertos para su secado en la oscuridad durante un mínimo de 14 días.

V.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Con ayuda de un microscopio óptico, que tiene acoplada una cámara de video JVC modelo TK-C1380, se obtuvieron manualmente las reproducciones bidimensionales de cinco neuronas por cada hemisferio, y por cada área a estudiar, así como de cada cerebro o sujeto experimental, (Fig.18). La selección de cada tipo de neurona estudiada, se llevó a cabo, de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin en el 2001.

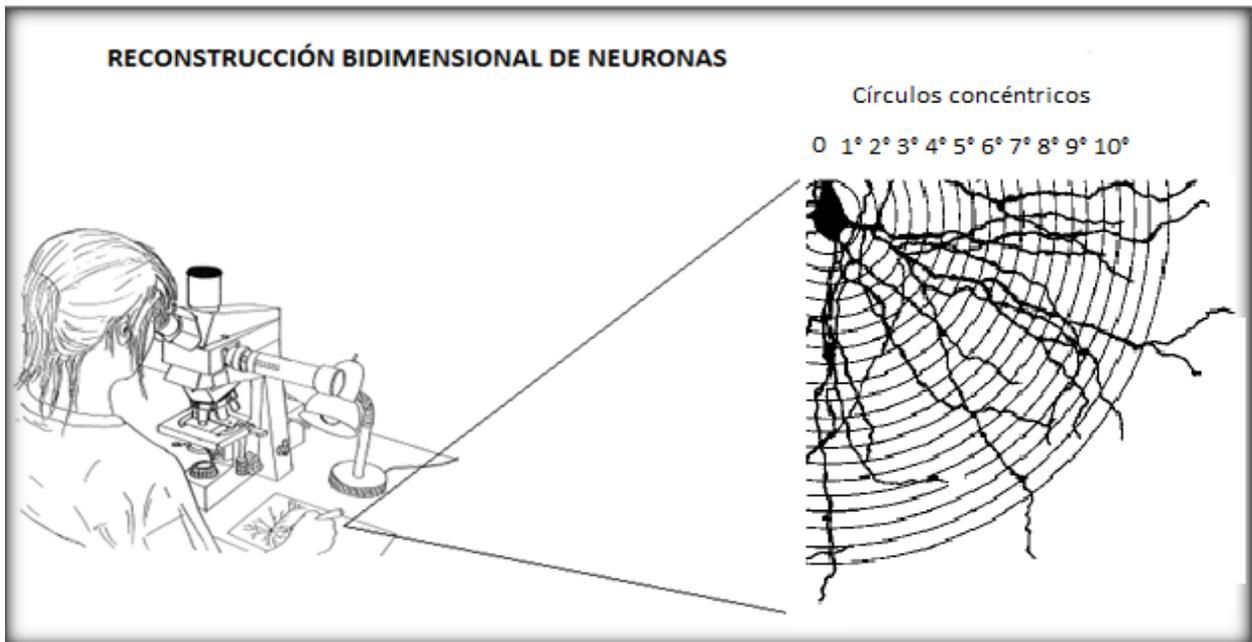


Fig. 19. A la izquierda la imagen del microscopio óptico con su cámara lúcida. A la derecha se observa la imagen de una neurona bajo una hoja de mica marcada con círculos concéntricos, cada círculo mide 0.5 cm con distancia equivalente a 10 μ m en el microscopio óptico, (Sholl, 1953).

V.5. UBICACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE NEURONAS QUE SE ANALIZARON

Neuronas piramidales en la corteza prefrontal capa III y capa V (fig.20)

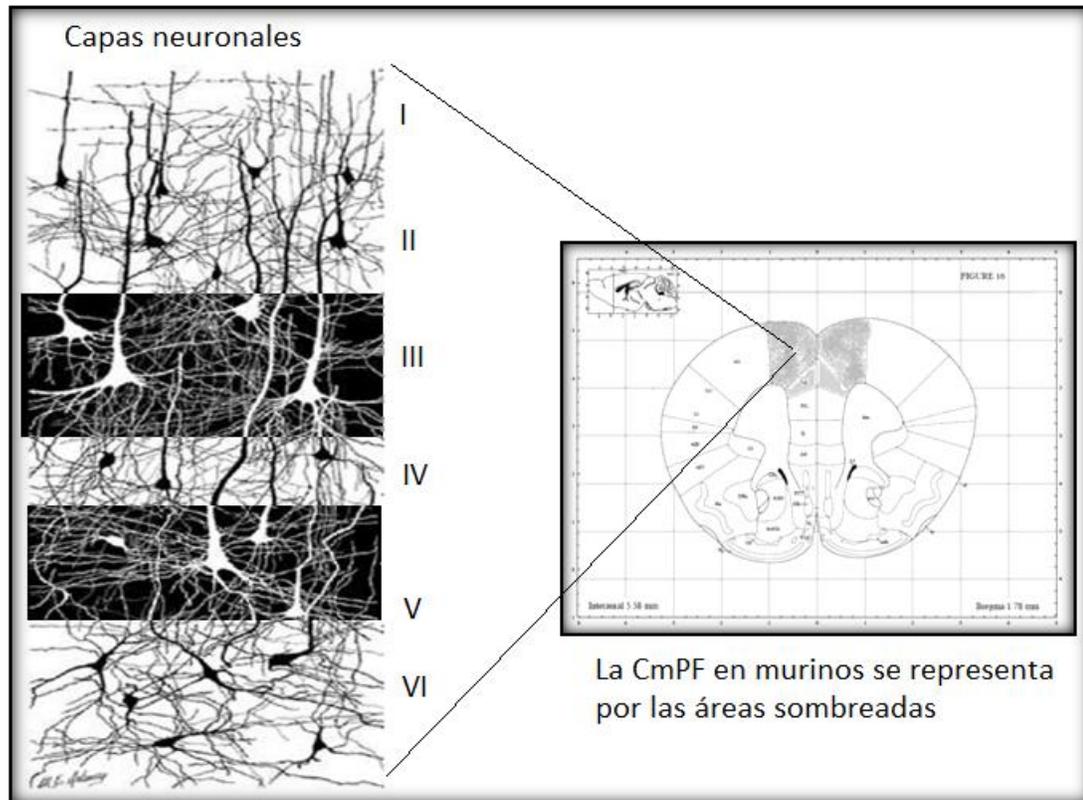


Fig.20. Representación a la izquierda de los diferentes estratos celulares en la CmPF y la ubicación de las neuronas piramidales que les corresponde; a la derecha en el área sombreada de gris, están las zonas donde se ubica la CmPF en murinos, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin en el 2001.

Neuronas piramidales en la amígdala basolateral (fig. 21)

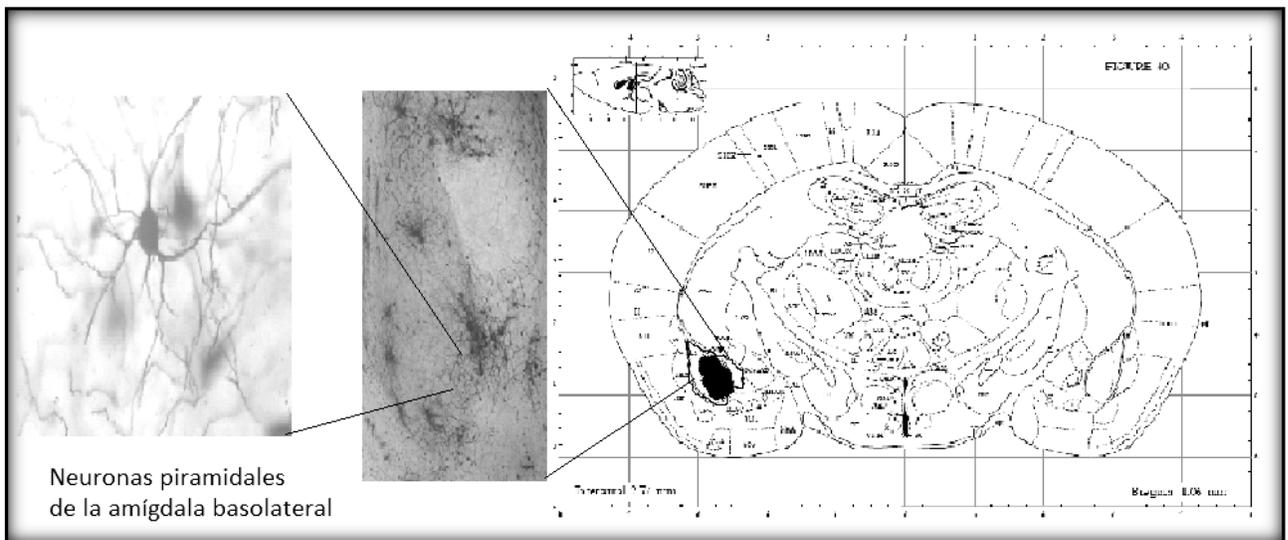


Fig.21. Representación esquemática de la ubicación de las neuronas piramidales de la amígdala basolateral, de acuerdo al atlas neurotáxico de Paxinos y Franklin en el 2001.

Ubicación de neuronas piramidales en el hipocampo dorsal región CA1 (fig. 22)

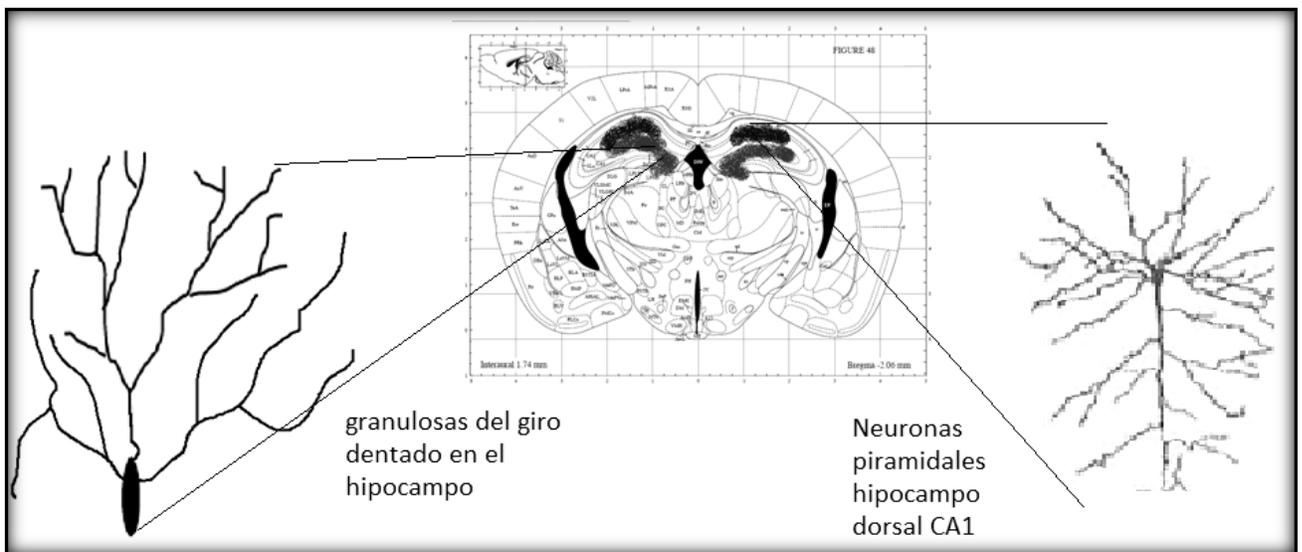


Fig.22. Representación en las zonas sombreadas superiores de la ubicación de las neuronas granulosas del giro dentado (a la izquierda), y las piramidales del hipocampo dorsal región CA1 (a la derecha) en el hipocampo, de acuerdo al atlas de Paxinos y franklin en el 2001.

Neuronas piramidales en el hipocampo ventral región CA1 (fig. 23)

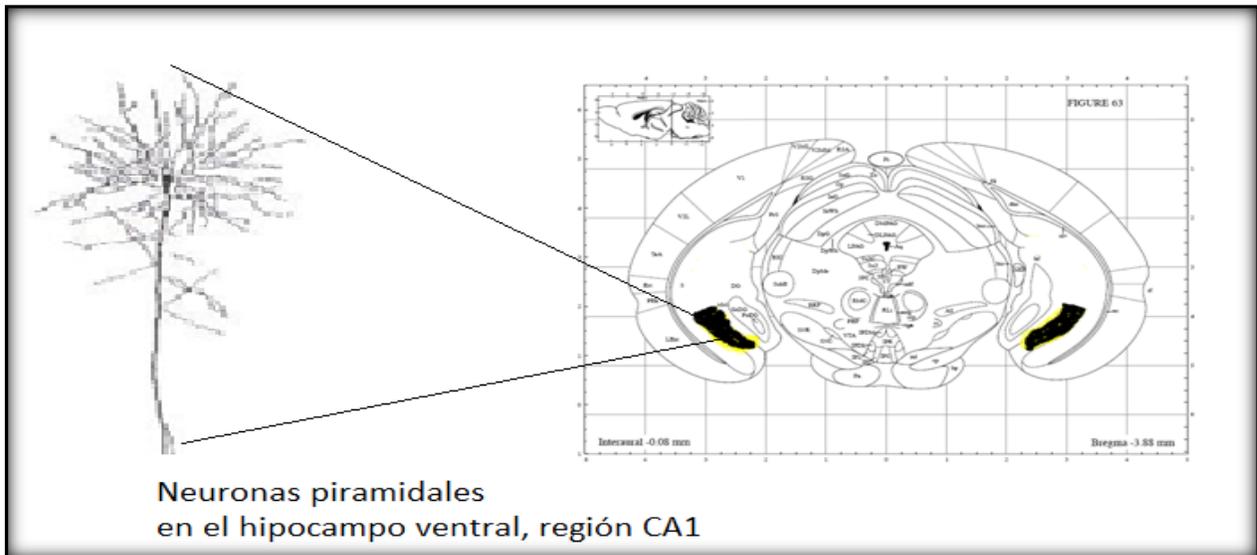


Fig.23. Representación de la zona (oscura), donde se ubican las neuronas piramidales del hipocampo ventral, región CA1, de acuerdo al atlas de Paxinos y Franklin en el 2001.

Neuronas espinosas medianas en el centro y coraza del núcleo accumbens (fig. 24)

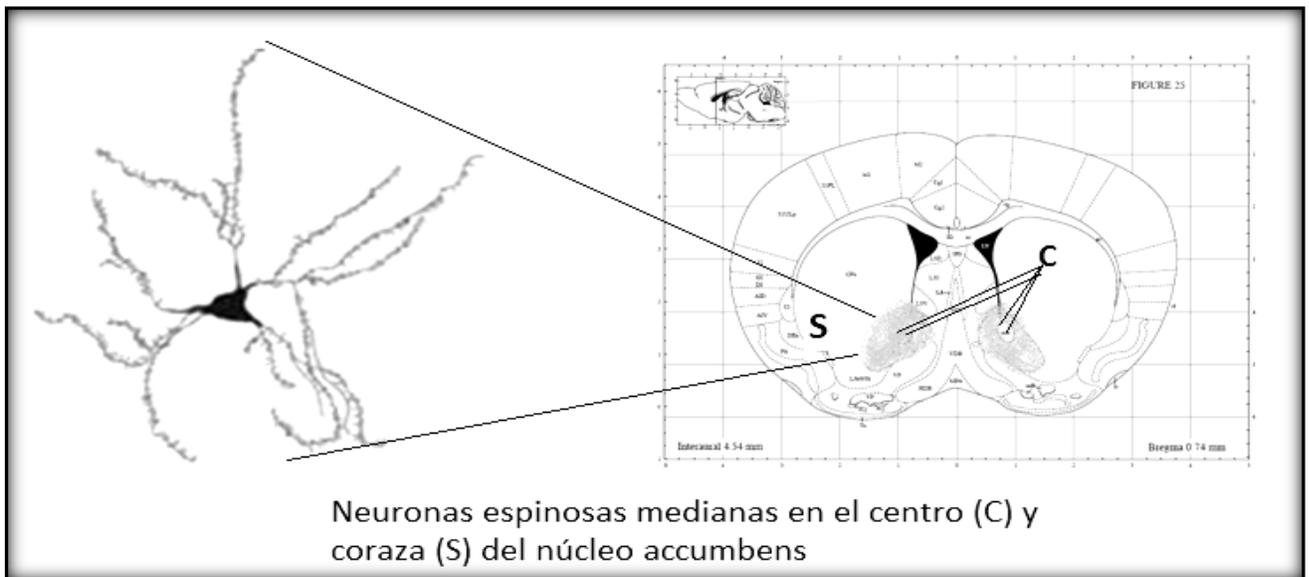


Fig.24. Representación de la zona (en gris) correspondiente al núcleo accumbens, en la cual se ubican las neuronas espinosas medianas, tanto del centro, como de la coraza, de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin en el 2001.

V. 6. CRITERIOS GENERALES PARA LA SELECCIÓN DE NEURONAS

Puntos importantes que se deben considerar al seleccionar cada neurona para su posterior representación bidimensional (Juárez y cols., 2003; Alquicer y cols., 2008; Juárez y cols., 2008).

- 1.- La neurona debe ubicarse en la zona que se decidió dibujar, de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin en el 2001.
- 2.- El tipo de neurona se elige dependiendo de su forma física característica, además de su ubicación, ya sea piramidal, espinosa mediana, granular etc.
- 3.- La neurona debe visualizarse completamente, se logra con una buena calidad de tinción Golgi-Cox.
- 4.- La neurona a elegir no debe tener dendritas quebradas o incompletas.
- 5.- Se deben dibujar tanto el soma de la neurona como las dendritas (seleccionadas de acuerdo al protocolo de investigación) encontradas en el primero y segundo plano de la imagen al microscopio óptico.

Obtenidos los dibujos, se prosiguió a la aplicación del análisis de Sholl.

V.7. ANÁLISIS DE SHOLL

Consistió en identificar el orden de cada dendrita con lápices de colores diferentes, identificándose como de primero, segundo, tercero, hasta n orden, posteriormente se colocó una plantilla (Fig. 18) transparente que cuenta con una serie de círculos concéntricos, de los cuales el círculo del centro debe coincidir con el soma, y de ésta manera se determinó el número de dendritas que intersectaron cada uno de los círculos; estos fueron los datos que se sometieron posteriormente al análisis estadístico. El análisis de Sholl antes descrito, nos arrojó datos para medir tres parámetros principales en cada neurona analizada: el primero es la “longitud dendrítica total”, que se refiere a la longitud total que alcanzó cada neurona, además de todas las intersecciones posibles que pueden coexistir en un solo círculo de medida, y que refleja la densidad de la “arborización dendrítica” (segundo parámetro medido), el tercer parámetro estudiado es la “longitud

mayor alcanzada por orden dendrítico”, en la que podemos identificar cuánto se alargó, o bien se contrajo un conjunto de dendritas del mismo orden, (Gibb y Kolb, 1998; Sholl, 1953).

La “densidad de espinas dendríticas” se obtuvo al tiempo que se terminó de dibujar cada neurona, identificamos la dendrita más distal de la neurona, y se dibujaron las espinas ubicadas en 10 μm (distancia equivalente a 1.8 cm) de segmento dendrítico, y por último se contabilizaron para su posterior análisis estadístico (Juárez y cols., 2003; Alquicer y cols., 2008; Juárez y cols., 2008).

V.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism versión 4.00, donde analizamos los datos obtenidos tanto de la actividad motora y los del análisis de Sholl. Específicamente para los parámetros de, densidad de espinas, y longitud total, se utilizó la prueba estadística de ANOVA de una vía, junto con una prueba post hoc NKS (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, por sus siglas en inglés); para los datos que correspondieron a la actividad motora, arborización, y a la longitud por orden, aplicamos la prueba de ANOVA de dos vías, y se aplicó la prueba post hoc de Bonferroni, todos los resultados se consideraron significativos si resultaron con una $P < 0.05$.

VI. RESULTADOS

VI.1. ACTIVIDAD MOTORA

Actividad motora, en (A) de la figura 25, los datos mostraron que, la conducta exploratoria aumentó tanto en los tres grupos experimentales de DON (0.1 mg), CBL (0.1 g), y en el combinado CBL+DON (0.1g+0.1mg) frente al grupo control ($F_{3, 168} = 4.01$, $P < 0.0001$), sin embargo entre ellos no hubo diferencias, es decir, la terapia combinada tuvo el mismo efecto que las monoterapias ($F_{15, 168} = 0.19$, $P = 0.99$). Se aplicó ANOVA de dos vías seguida de la post-hoc de Bonferroni. En (B) de la misma figura, se muestra un histograma, con el registro de los movimientos totales para cada grupo en 60 minutos que duró la prueba.

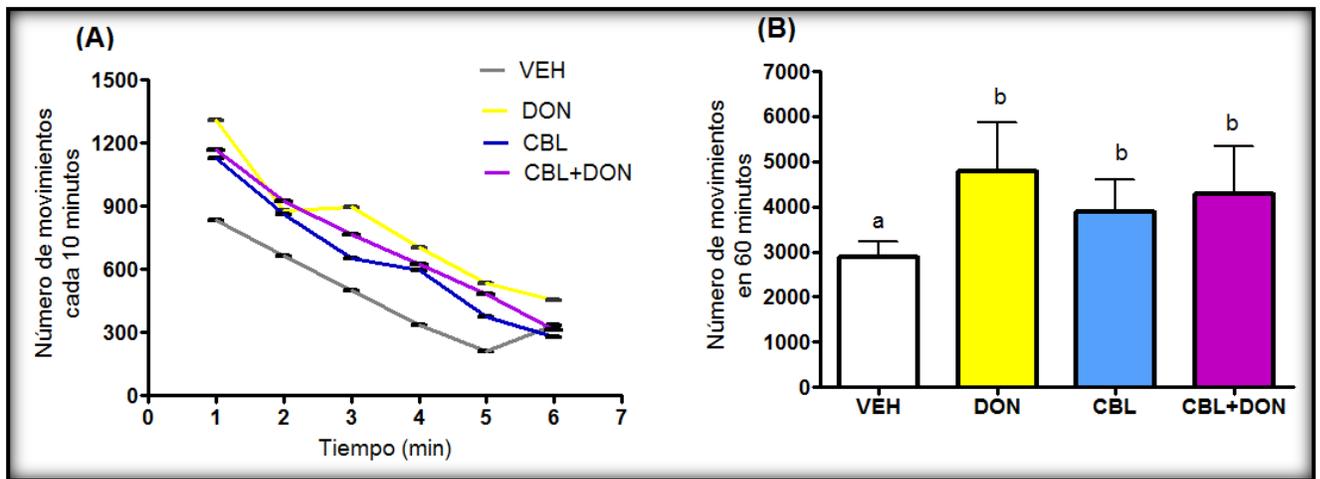


Fig. 25. En (A) se presentan los registros de la actividad motora cada diez minutos, y en (B) el registro del número total de movimientos en 60 minutos de duración de la prueba. Los grupos experimentales aumentaron la actividad exploratoria frente al grupo control ($P < 0.0001$), más no hubo diferencias entre ellos.

VI.2. RESULTADOS MORFOLÓGICOS

A continuación se presentan los resultados sobre los cambios morfológicos encontrados para las neuronas que se analizaron en cada región cerebral.

VI.2.1. Morfología de las neuronas piramidales en la corteza media prefrontal, capa III

En la Figura 26 observamos los resultados del análisis de Sholl en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal capa III. En (A) se muestra la arborización de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal capa III, la terapia combinada de CBL+DON (0.1g/0.1mg), generó aumento sumatorio significativo de las intersecciones dendríticas respecto al grupo control, y también frente a los grupos con monoterapia de DON (0.1 mg) y CBL (0.1 g) ($F_{3\ 840}=103.30$, $P < 0.0001$). También observamos que el aumento significativo de las intersecciones dendríticas se registró en los círculos 5 al 16 (recuadro dentro de la gráfica en A), (ANOVA de dos vías, seguida de la post-hoc Bonferroni). En (B) se observa el aumento significativo de la longitud dendrítica total para cada grupo experimental, recalando el efecto sumatorio del grupo experimental con la terapia combinada (ANOVA de una vía seguida de la post-hoc Newman-Keuls, ($F_{3\ 36}=23.89$, $P < 0.05$).

En la figura 27 observamos los resultados en los parámetros de la longitud por orden dendrítico en (A), y en (B) la densidad de espinas distales dendríticas; en el caso de la longitud por orden, el análisis de Sholl arrojó aumento significativo de la longitud por orden

para el grupo con terapia combinada de CBL+DON (0.1g/0.1mg) frente a todos los demás grupos experimentales, incluyendo al control; éste aumento de la longitud dendrítica se presentó en los ordenes 2° al 4° (ANOVA de dos vías seguida de una post-hoc de Bonferroni, $F_{3, 252}=15.71$, $P<0.0001$), los grupos experimentales con la monoterapia, no demostraron diferencia significativa de su longitud por orden frente al grupo control, ni entre ellos. Respecto a la densidad de espinas distales (en B de la misma Figura 26), los tres grupos experimentales aumentaron la densidad de espinas frente al control ($F_{3, 28}= 6.418$, $P<0.05$), pero sin mostrar diferencia estadística entre ellos (ANOVA de una vía seguida de una post-hoc Newman-Keuls).

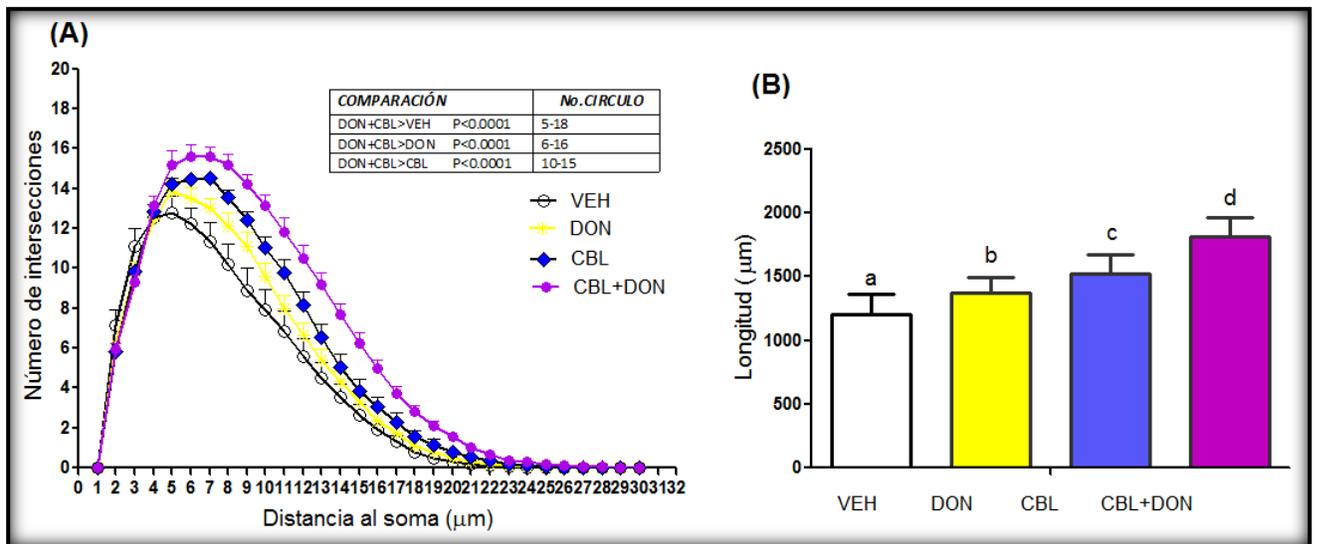


Fig. 26. En (A) se presenta la arborización registrada en las neuronas piramidales de la CmPF capa III, en (B) la longitud dendrítica total para cada grupo experimental. Las letras a, b, c, y d en la gráfica de longitud total indican diferencia significativa entre los grupos ($P<0.0001$).

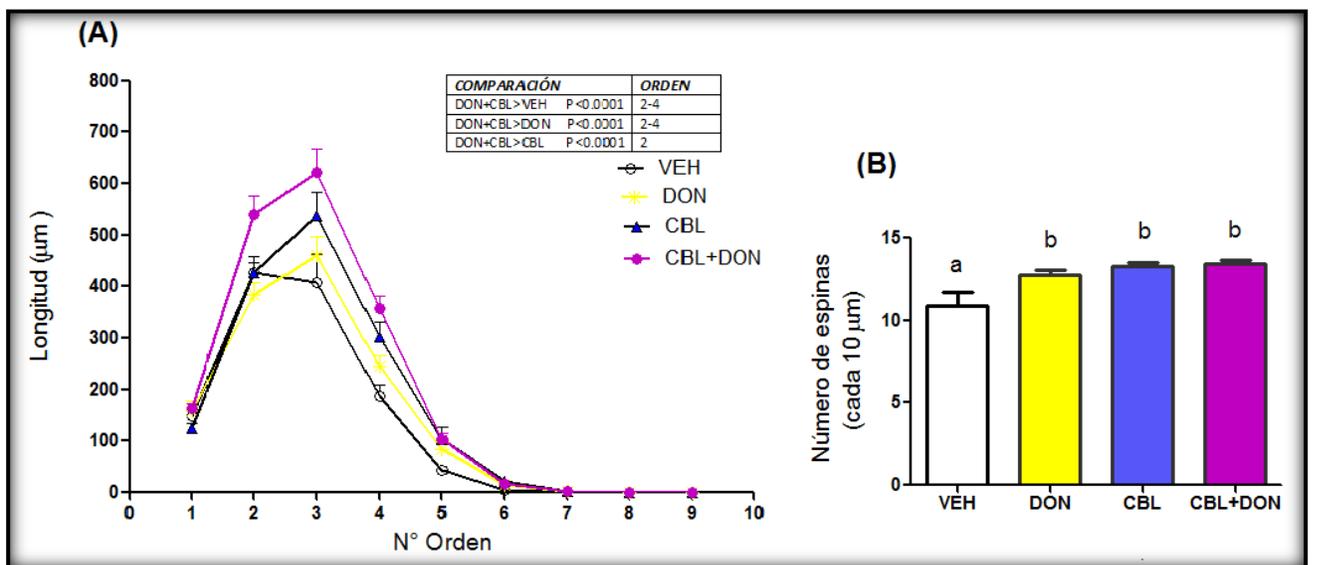


Fig. 27. En A se presentan los datos de longitud por orden dendrítico para las neuronas piramidales de la corteza prefrontal capa III, observamos que la mayor longitud por orden, la alcanzó el grupo experimental con la terapia combinada; a la derecha en B, se observan los resultados de la densidad de las espinas distales para la misma región, en los cuales, la densidad aumentó para los tres grupos experimentales frente al control, pero sin mostrar diferencia estadística entre ellos, es decir, que la densidad de espinas no mostró el efecto farmacológico aditivo en el grupo combinado ($P<0.05$).

VI.2.2. Resultados morfológicos en las neuronas piramidales de la corteza media prefrontal capa V

En la figura 28 inciso (A), se presentan los resultados que arrojó el análisis de Sholl después de evaluar la morfología de las neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal; en cuanto al parámetro de arborización, los datos mostraron que los tres grupos experimentales aumentaron su arborización dendrítica frente al grupo control (ANOVA de dos vías $F_{3,840} = 38.39, P < 0.0001$); al someter los datos a la prueba post-hoc de Bonferroni, observamos de forma exhaustiva que el grupo combinado CBL+DON (0.1g/0.1mg) aumentó significativamente su arborización específicamente a nivel de los círculos N° 10 al 13 frente a los grupos con monoterapia y el grupo control; de la misma forma, el grupo CBL aumentó significativamente ($P < 0.0001$) sus intersecciones dendríticas sólo a nivel de los círculos N° 3 al 5 frente al grupo control.

En el inciso B de la misma figura 28, se reportan los resultados de la longitud total dendrítica en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal capa V, en la que se observa que no los grupos experimentales no fueron diferentes estadísticamente frente al grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3,28} = 87.55, P = 4656$) puede observarse cierta tendencia al aumento por parte del grupo que recibió la terapia combinada de ambas drogas, sin embargo, no alcanzó la significancia.

En cuanto al parámetro de longitud por orden (figura 29 inciso A), se demostró que la terapia combinada de ambas drogas, aumentó significativamente la longitud por orden frente a los grupos experimentales con monoterapia, y frente al grupo control, lo cual demuestra el efecto sumado de la aplicación de la terapia combinada en éste parámetro; obtuvimos los resultados descritos, tras el tratamiento de los datos con una ANOVA de dos vías, seguida por la prueba post-hoc de Bonferroni, ($F_{3,196} = 4.58, P < 0.0001$). Respecto a la densidad de espinas en (B) de la figura 29, no se encontraron diferencias estadísticas en los grupos experimentales ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3,25} = 1.206, P = 0.3281$).

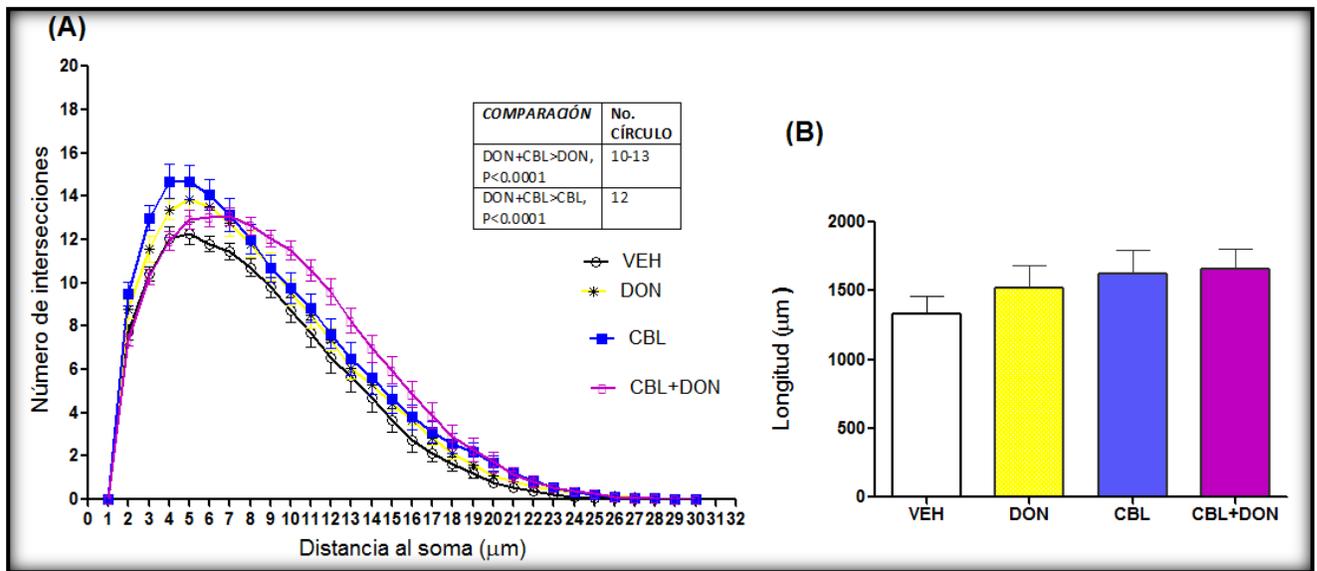


Fig. 28. En A observamos el comportamiento de los datos en cuanto a la arborización generada en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal capa V, en la que el grupo combinado aumentó sus intersecciones frente a los grupos con monoterapia en los círculos N° 10 al 13 ($P<0.0001$). En caso de la longitud total, no cambió para ninguno de los tres grupos experimentales frente al control.

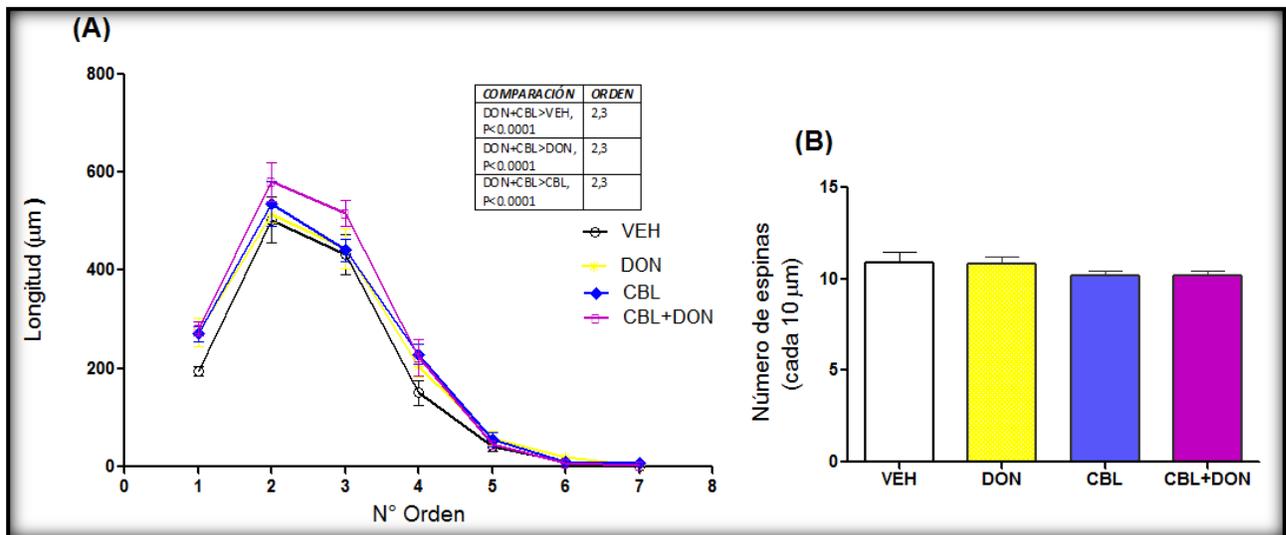


Fig. 29. En (A) observamos los datos evaluados en cuanto al parámetro de longitud por orden dendrítico en la CmPF capa V, el cual se demostró el efecto sumatorio de la terapia combinada frente a las monoterapias de ambas drogas ($P<0.0001$); y en (B) observamos que la densidad de espinas no sufrió cambios con las monoterapias, ni con la combinación de ambas.

VI.2.3. Resultados morfológicos en las neuronas piramidales de la amígdala basolateral

En la figura 30 se presentan los resultados del análisis de Sholl, aplicado a las neuronas piramidales de la amígdala basolateral, en A se muestra la arborización dendrítica, en la cual no hubo diferencias estadísticas de los grupos experimentales frente al grupo control ($F_{90\ 868} = 1.17, P = 0.1433$), sin embargo, al aplicar la prueba post-hoc de Bonferroni tras el ANOVA de dos vías, se observaron diferencias estadísticas puntuales, manifestadas por el aumento de las intersecciones en los círculos 4, 6, 7, y 13 para el grupo de CBL frente al control, y el de la terapia combinada también frente al control, lo cual sugiere cierta tendencia de la terapia combinada al aumento de la arborización en mayor grado que las monoterapias ($F_{30\ 868} = 590.94, P < 0.0001$). Para el caso de la evaluación del parámetro de longitud total dendrítica, en (B), ni la monoterapia de cada droga, ni su combinación ejercieron cambios morfológicos (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3\ 28} = 1.146, P = 0.3478$).

Respecto a los parámetros de longitud por orden dendrítico, y densidad de espinas para las piramidales de la capa V en la CmPF, tenemos que, la longitud por orden en (A) figura 31, no cambió estadísticamente la longitud en los tres grupos experimentales frente al control; sin embargo ocurrió algo singular, observamos que los tres grupos experimentales aumentaron la longitud dendrítica a nivel del 4° y 5° ordenes, no así para los demás ordenes registrados, de hecho la línea de cada grupo tratado se recorrió un orden en la gráfica; encontramos éstos resultados puntuales, al aplicar la prueba post-hoc de Bonferroni tras la ANOVA de dos vías $F_{3\ 168} = 0.79, P < 0.05$). Respecto a la densidad de espinas en (B) de la figura 30, no hubo cambios estadísticos de los tres grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3\ 26} = 1.111, P = 0.3625$).

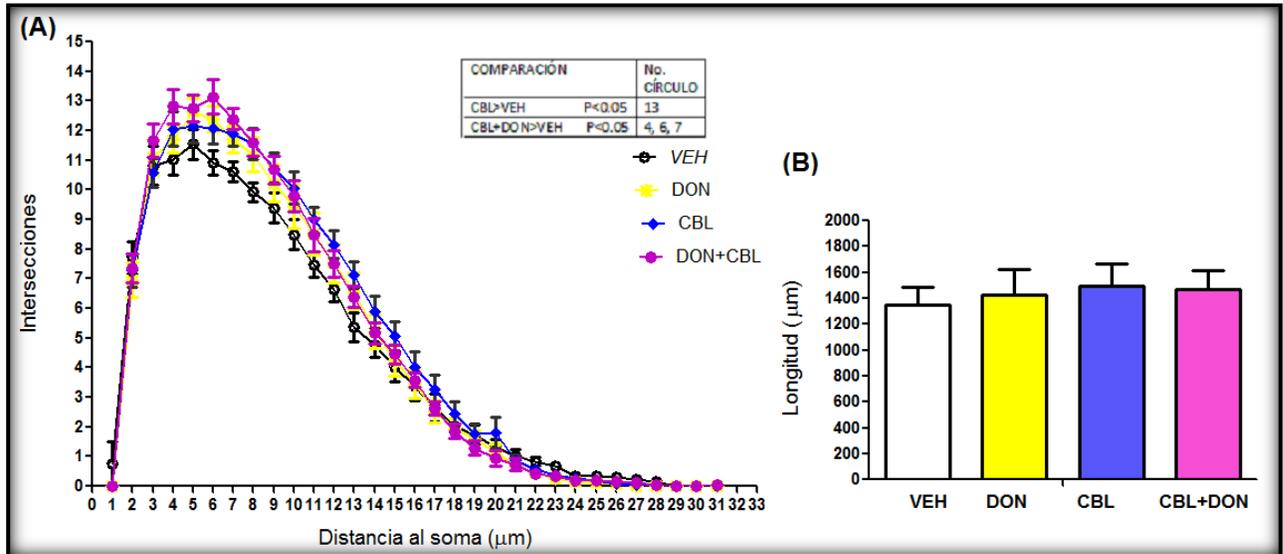


Fig. 30. Datos de arborización en (A), y los de longitud dendrítica total en (B), para neuronas piramidales de la amígdala basolateral. Parámetros que no cambiaron estadísticamente tras los tratamientos.

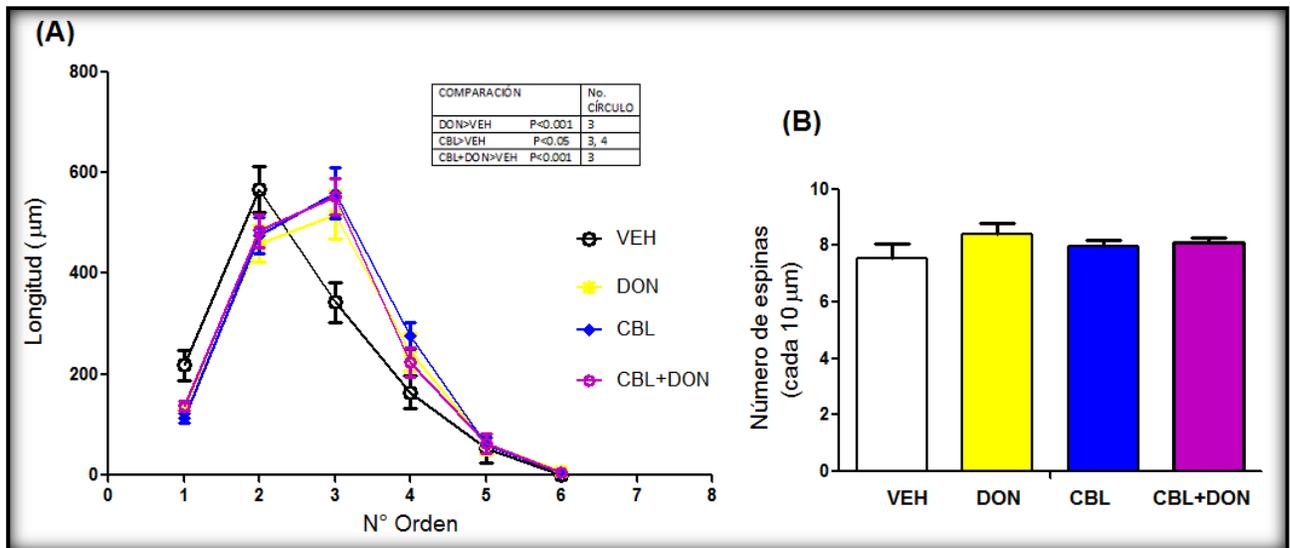


Fig. 31. Resultados en los parámetros de longitud por orden en (A), y densidad de espinas en (B), de neuronas piramidales de amígdala basolateral, para los cuales, no se encontraron diferencias estadísticas.

VI.2.4. Resultados morfológicos en las neuronas piramidales de la región CA1 en el hipocampo dorsal

En la figura 32 se reportan los resultados en cuanto a la arborización inciso (A), donde las intersecciones dendríticas disminuyeron significativamente con la monoterapia de CBL (0.1g) y la combinada CBL+DON (0.1g/0.1mg), en el caso de la monoterapia con DON, éste mantuvo sin cambios la arborización dendrítica frente al grupo control. Resultados encontrados tras la aplicación de la ANOVA de dos vías, seguida de la prueba post-hoc de Bonferroni ($F_{3\ 756} = 26.74$, $P < 0.0001$). Con respecto a la longitud dendrítica total en (B) de la figura 32, se confirman los resultados de arborización, al demostrarse la disminución de la longitud total dendrítica en el grupo de CBL y el combinado, frente a los grupos control y DON (ANOVA de una vía, seguida de la prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3\ 36} = 9.916$, $P < 0.0001$).

En la figura 33 se presentan los resultados en la evaluación de los parámetro de longitud por orden dendrítico en (A), y los de la densidad de espinas distales (en B), en cuanto al primero, se observó sólo una disminución puntual de la longitud para los tres grupos experimentales frente al grupo control, a nivel del 4° y 5° ordenes, (ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni, $F_{7\ 224} = 290.87$. $P < 0.05$); y con respecto a la densidad de las espinas, se observa en (B) de la figura 33, que únicamente el grupo DON aumentó la densidad frente al grupo control y a los demás grupos experimentales (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3\ 28} = 10.33$, $P < 0.0001$).

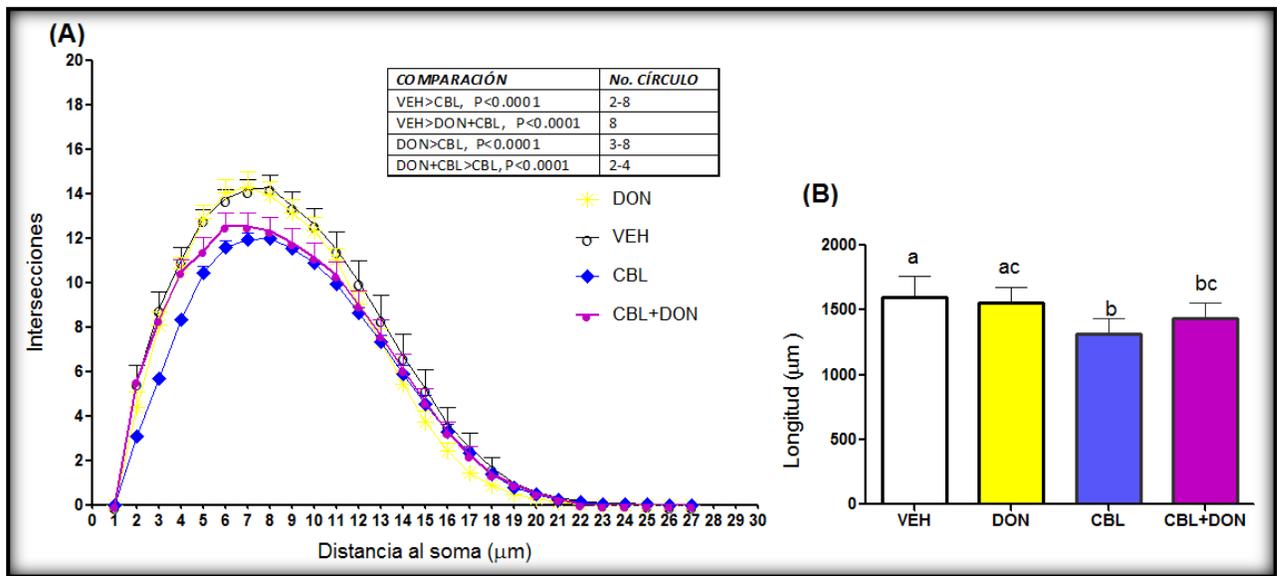


Fig. 32. Resultados de los cambios morfológicos de arborización en (A) presentados en las neuronas piramidales del hipocampo dorsal región CA1, así como los de longitud total dendrítica en (B), la cual disminuyó en los grupos de CBL y el combinado (CBL+DON), ($P<0.0001$).

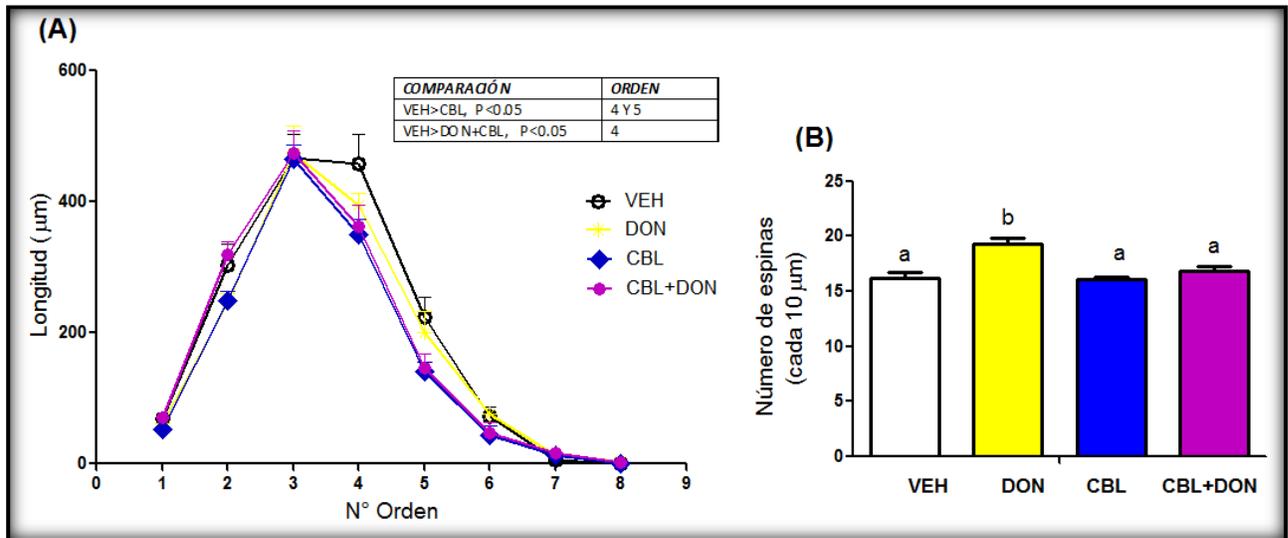


Fig. 33. Resultados morfológicos de los cambios en la longitud por orden dendrítico en (A) presentados por las neuronas piramidales del hipocampo dorsal en la región CA1, en la que sólo hubo cambios a nivel del 4° y 5° ordenes; además de los cambios presentados en la densidad de espinas en (B), los cuales demostraron aumento de espinas tras el tratamiento con DON frente al grupo control, no así en los demás tratamientos experimentales ($P<0.0001$).

VI.2.5. Resultados morfológicos registrados en las neuronas piramidales del hipocampo ventral región CA1

En la figura 34 observamos que la arborización dendrítica en (A) no presentó cambios estadísticos significativos para ninguno de los tres grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni $F_{3, 108} = 0.0758$, $P = 0.9729$). Respecto a la longitud total por orden dendrítico en (B), tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales y el grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3, 20} = 0.2049$, $P = 0.8918$).

En la figura 34, presentamos los resultados en cuanto a la longitud por orden dendrítico (A), en los cuales no se encontraron cambios de longitud de los tres grupos experimentales frente al control (ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni, $F_{3, 6} = 0.9433$, $P = 0.4216$). En cuanto a la densidad de espinas en B de la misma figura, se observó que los tres grupos experimentales aumentaron la densidad de sus espinas frente al control (ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls $F_{3, 23} = 11.02$, $P < 0.0001$); sin embargo, no se registró diferencia estadística del grupo combinado CBL+DON (0.1g/0.1mg) frente a los demás grupos experimentales y el grupo control, a pesar de que visualmente se observa tendencia al aumento.

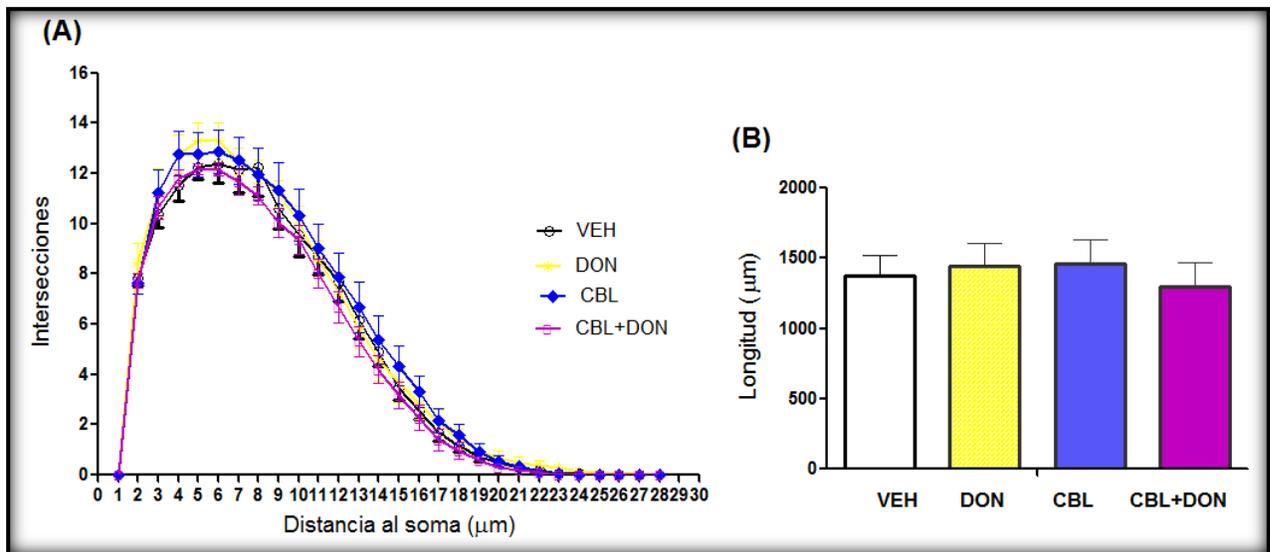


Fig. 34. Resultados de la arborización dendrítica en las neuronas piramidales del hipocampo ventral región CA1, inciso (A), en la cual no se encontró diferencias entre los tres grupos experimentales frente al grupo control. Respecto a la longitud total de ésta misma región, tampoco se encontraron cambios de longitud total, en los grupos experimentales frente al control.

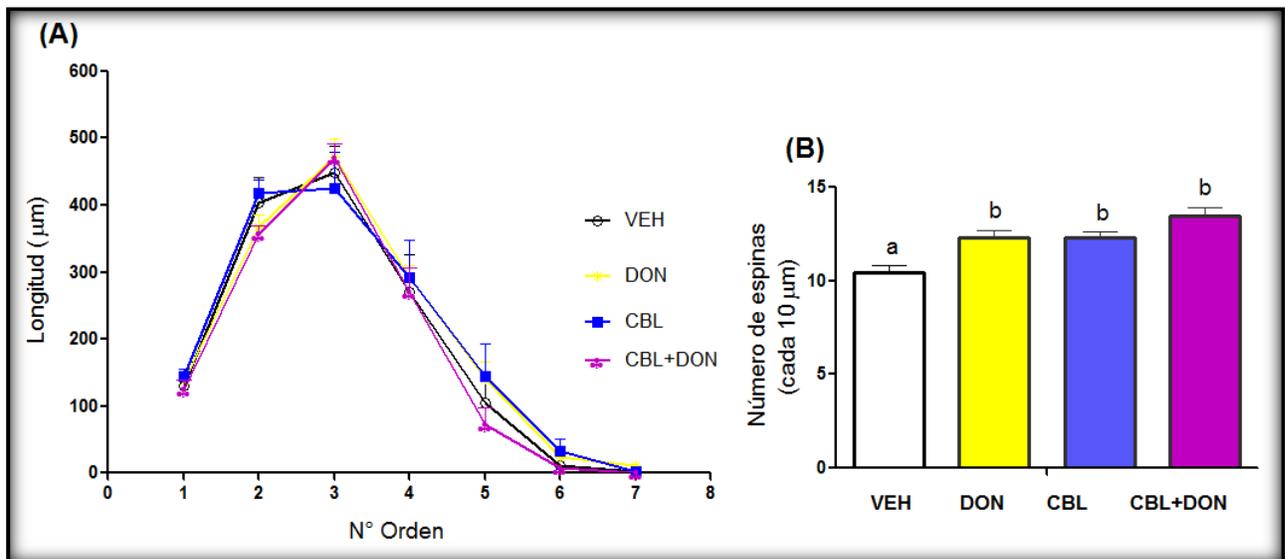


Fig. 35. Resultados de la longitud por orden dendrítico, en neuronas piramidales de la región CA1 en el hipocampo ventral (A), en las cuales, no se encontraron diferencias significativas de los grupos experimentales frente al grupo control. En (B) presentamos los resultados de la densidad de espinas dendríticas, en la cual hubo aumento significativo del número de espinas para los tres grupos experimentales frente al grupo control ($P < 0.0001$), aunque se observa cierta tendencia del grupo combinado al aumento, sin haber sido significativo.

VI.2.6. Resultados de la morfología estudiada sobre las neuronas granulosas del giro dentado en el hipocampo.

De la figura 36 e inciso (A) presentamos los resultados del número de intersecciones dendríticas resultantes, parámetro que demostró aumentar en los círculos N° 9 al 19, para el grupo combinado CBL+DON (0.1g/0.1mg) frente al grupo control, de igual forma, para el grupo que recibió la monoterapia de DON (0.1mg) aumentó la arborización dendrítica en comparación con el grupo control (ANOVA de dos vías seguida por una prueba post-hoc de Bonferroni, $F_{3\ 784} = 53.25$, $P < 0.0001$). Respecto al parámetro de longitud total dendrítica en (B), no se encontraron cambios estadísticos de los grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3\ 28} = 1.356$, $P = 0.2765$).

En la figura 37 inciso (A), se presentan los resultados de la longitud por orden dendrítico, en los cuales, los tres grupos experimentales aumentaron su longitud frente al grupo control (ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni, $F_{3\ 168} = 5.33$, $P < 0.0001$) pero sin haberse registrado alguna diferencia estadística entre ellos. Respecto a la densidad de espinas en el inciso (B), todos los grupos experimentales aumentaron su densidad frente a la del grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3\ 28} = 26.01$, $P < 0.0001$); además, en éste parámetro sí hubo diferencias entre grupos experimentales, los dos grupos que recibieron monoterapia de DON (0.1mg) y el de CBL (0.1g) aumentaron significativamente su densidad de espinas frente al grupo combinado CBL+DON (0.1g/0.1mg) ($P < 0.05$).

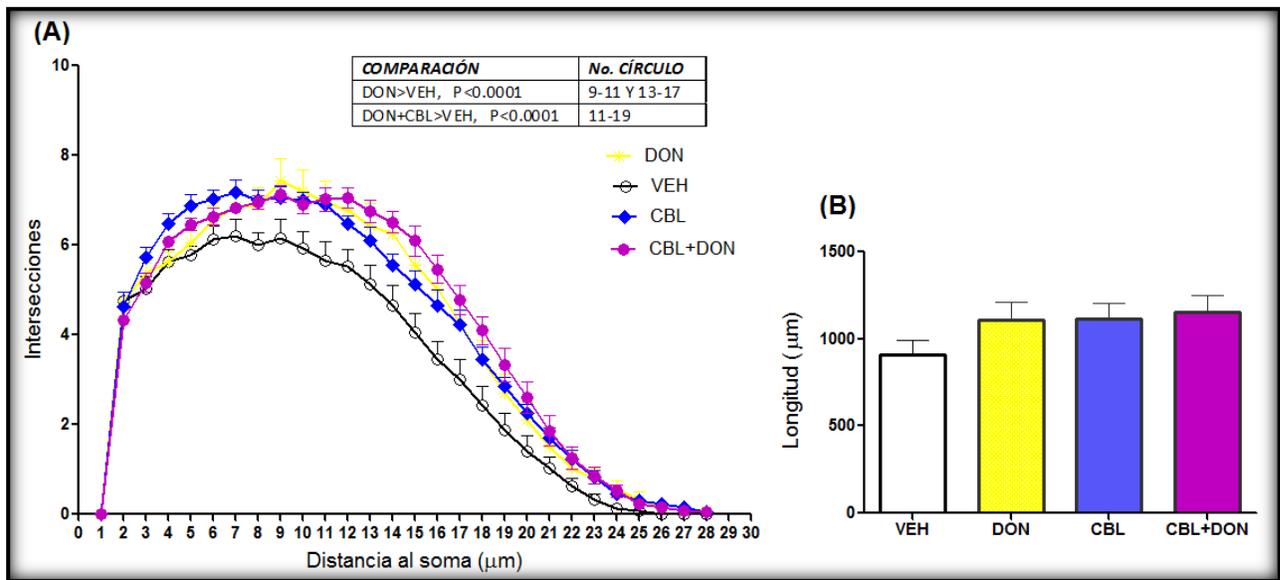


Fig. 36. Resultados de la arborización en (A) de neuronas granulosas del giro dentado hipocámpales, en los cuales, los tres grupos experimentales aumentaron su arborización dendrítica frente al control, pero sin haberse registrado cambios estadísticos entre ellos ($P < 0.0001$). En el inciso (B) se observan los resultados de los datos sobre la longitud total en las mismas neuronas, parámetro que no cambió de forma estadística, aunque se puede detectar visualmente tendencia al aumento de la longitud del grupo que recibió la terapia combinada.

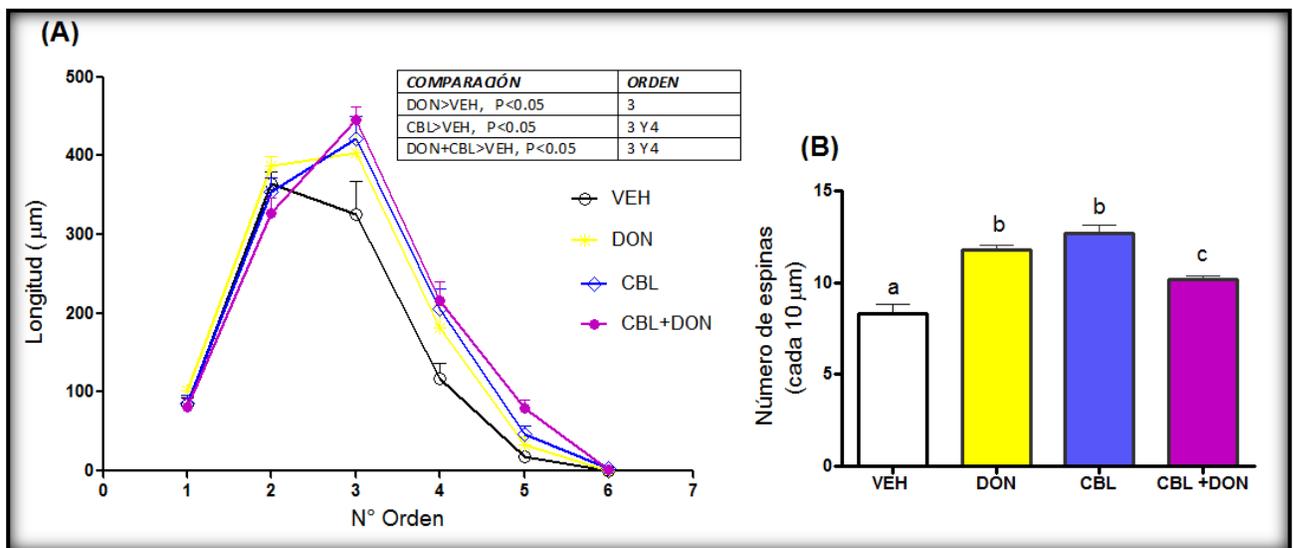


Fig. 37. Resultados en el inciso (A) de la longitud por orden dendrítico en las neuronas granulosas del giro dentado, las cuales demostraron aumento de su longitud en los grupos DON y el de la terapia combinada CBL+DON frente al grupo control, pero sin haberse registrado cambios entre ellos. En cuanto a la densidad de espinas en (B), los grupos experimentales aumentaron su densidad frente al control ($P < 0.0001$), entre ellos tanto la monoterapia de DON, como la de CBL, aumentaron su longitud de forma significativa frente al grupo que recibió terapia combinada ($P < 0.0001$).

VI.2.7. Resultados de la morfología sobre las neuronas espinosas medianas ubicadas en el centro del núcleo accumbens.

En la figura 38 inciso (A), se registran los resultados arrojados por el análisis de Sholl en la arborización, la cual demostró aumentar bajo el tratamiento con monoterapia de DON (0.1mg) frente al grupo que recibió terapia combinada CBL+DON (0.1g/0.1mg), y frente al grupo control, específicamente a nivel de los círculos N° 2 al 4 (ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni, $F_{3,784} = 15.19$, $P < 0.0001$). En cuanto a la longitud total dendrítica en el inciso (B) de la misma figura, no se registraron cambios significativos de los tres grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3,28} = 0.3512$, $P = 0.7886$).

En la figura 39 inciso (A) se registran los cambios encontrados para el parámetro de longitud por orden dendrítico, el cual no registró cambios estadísticos de los grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de dos vías $F_{3,196} = 1.49$, $P = 0.2178$), pero al realizar la prueba post-hoc de Bonferroni se observó un cambio puntual para el grupo de DON (0.1mg), manifestado por el mayor aumento de su longitud a nivel del 3° orden dendrítico ($P < 0.05$) frente al grupo control. En cuanto a la densidad de espinas en (B) de la misma figura, no se registraron cambios estadísticos de ninguno de los grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3,28} = 2.868$, $P = 0.0543$).

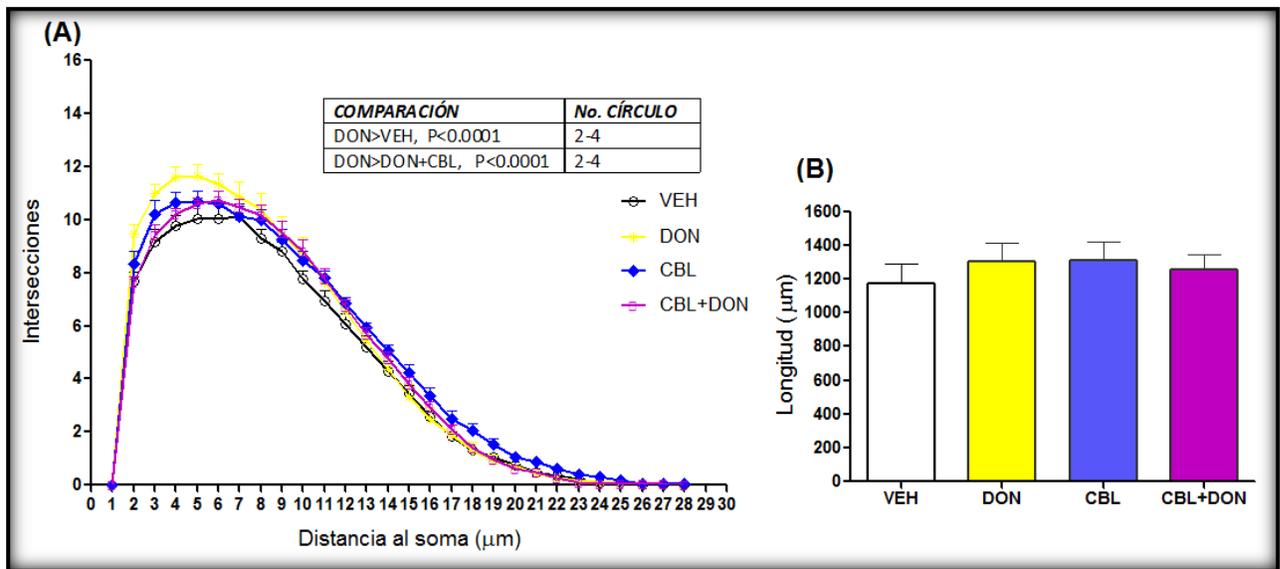


Fig. 38. Resultados de la arborización en (A) registrada en las neuronas espinosas medianas en el centro del núcleo accumbens, la cual aumentó en el grupo con DON frente al grupo control y el combinado ($P < 0.0001$). En cuanto a la longitud total dendrítica en (B) de las mismas neuronas, no se observaron cambios estadísticamente diferentes en los tres grupos experimentales frente al grupo control.

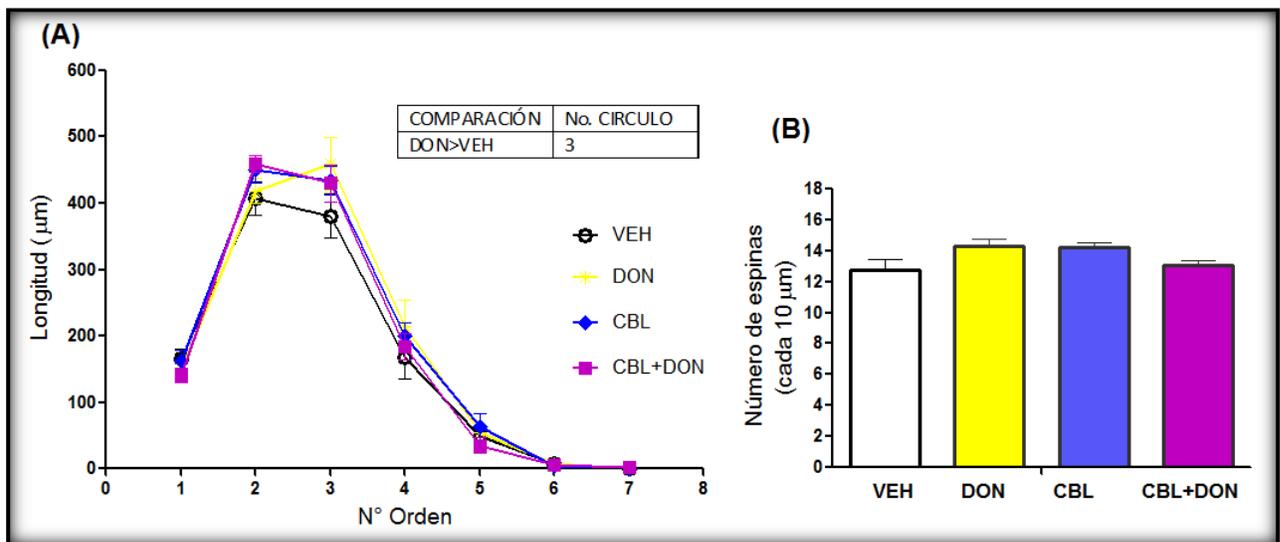


Fig. 39. Resultados de la longitud por orden dendrítico en (A), sobre las neuronas espinosas medianas en el centro del núcleo accumbens, en las cuales aumentó la arborización en el grupo DON frente al grupo control, y de igual forma frente al grupo que recibió la terapia combinada ($P < 0.0001$). En cuanto a la densidad de espinas en (B), no se observaron cambios en ninguno de los tres grupos experimentales frente el grupo control.

VI.2.8. Resultados morfológicos sobre las neuronas espinosas medianas en la coraza del núcleo accumbens

En la figura 40 inciso (A) se reportan los resultados de la arborización dendrítica, la cual aumentó para el grupo experimental con CBL (0.1g) frente al grupo con DON (0.1mg) (ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni, $F_{3, 840} = 12.98$, $P < 0.0001$). En cuanto a la longitud total dendrítica en (B), no se registraron cambios estadísticos en ninguno de los tres grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3, 36} = 2.140$, $P = 0.1122$).

En la figura 41 inciso (B) se reportan los resultados de la longitud por orden dendrítico, parámetro que estadísticamente no cambió en ninguno de los tres grupos experimentales frente al grupo control (ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni, $F_{3, 224} = 1.82$, $P = 0.1450$); sólo a nivel del 3° orden dendrítico se registró un cambio puntual, en el que el grupo con DON (0.1mg) y el grupo combinado CBL+DON (0.1g/0.1mg) disminuyeron su longitud de orden en éste punto ($P < 0.0001$) frente al grupo control y el de CBL (0.1g). En cuanto a la densidad de espinas en (B) de la figura 41, sólo el grupo que recibió la monoterapia de CBL (0.1mg) aumentó su densidad de espinas frente al grupo control (ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Newman-Keuls, $F_{3, 28} = 3.770$, $P < 0.05$).

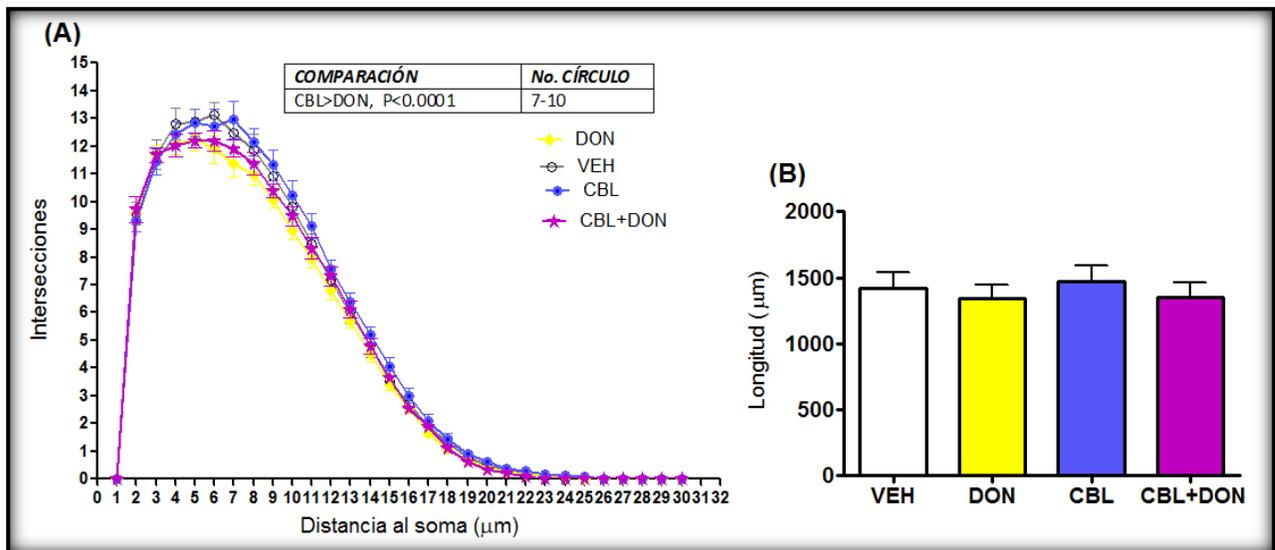


Fig. 40. Resultados de la arborización dendrítica en inciso (A), para las neuronas espinosas medianas de la coraza, en el núcleo accumbens, la cual aumentó en el grupo con CBL frente al grupo con DON ($P<0.0001$). En (B) de la misma figura, se presentan los resultados de la longitud total dendrítica, la cual no cambió estadísticamente para ninguno de los tres grupos experimentales frente al grupo control.

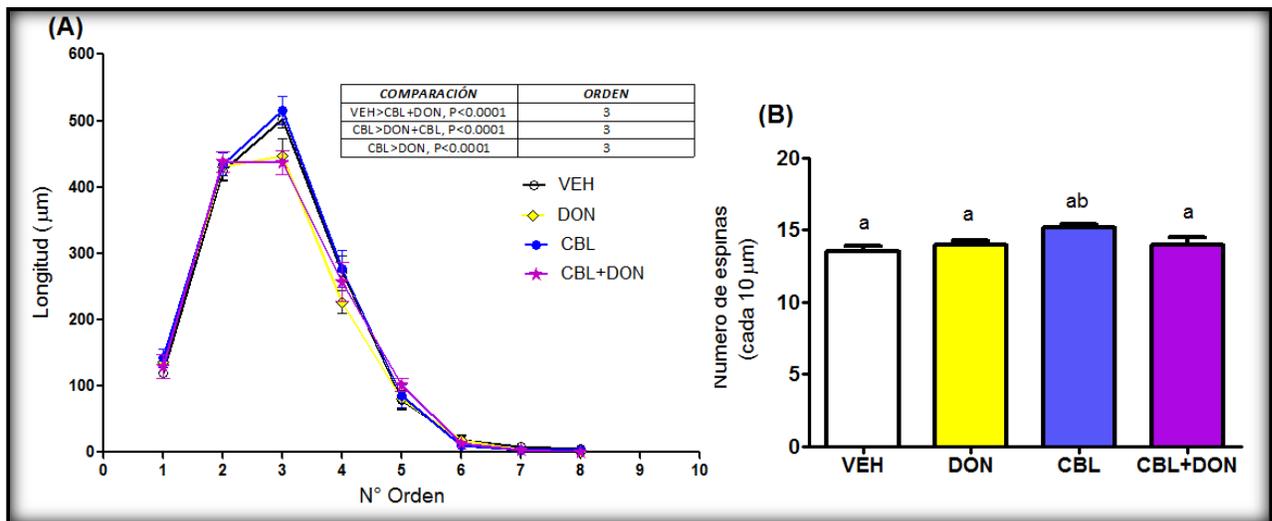


Fig. 41. Resultados de la longitud por orden en (A), en las neuronas espinosas medianas de la coraza en el núcleo accumbens, la cual no cambió para ninguno de los tres grupos experimentales frente al grupo control, se obtuvieron cambios sólo a nivel del 3° orden dendrítico, en el cual los grupos de DON y el grupo combinado CBL+DON disminuyeron su longitud de orden frente al grupo control y el de CBL. De igual forma, en (B) se encuentran los resultados de la densidad de espinas sobre las mismas neuronas, la cual aumentó sólo para el grupo con CBL frente a los demás grupos experimentales ($P<0.05$).

VII. DISCUSIÓN

Para el presente estudio, nuestro objetivo fue aplicar el tratamiento combinado de DON+CBL a ratones de siete meses durante nueve semanas, para analizar los efectos sobre la conducta motora y la morfología, tanto de neuronas piramidales como de las espinosas medianas; ambos tipos neuronales, involucradas en funciones cognitivas y conductuales. Se aplicó la prueba de actividad motora en ambiente nuevo y campo cerrado, la cual evalúa los movimientos motores, además de un cierto grado de estrés implicado en la reacción de los animales a esta prueba (Alquicer y cols., 2008; Juárez y cols., 2003; Martínez-Téllez y cols., 2009).

El control de la actividad motora en mamíferos como el ratón y el hombre, está regulado por interacciones entre factores motivacionales y la actividad neuronal de áreas particulares en el SNC, que incluyen a estructuras como los ganglios basales, sistema límbico, y la circuitería cortico-estriatal-pálido-pontino; en la cual, se incrementa la liberación de dopamina al introducir a los animales en un ambiente nuevo, (Castro-Alamancos, 2003; Fernández-Espejo, 2000; Klarner y cols., 1998; Viggiano y cols., 2003). A este respecto, el NAcc (considerado como una interfase límbico-motora) es el centro que regula la actividad motora generada por estímulos ambientales motivacionales y novedosos, por lo que juega un papel importante para situaciones adaptativas, al desarrollar una conducta motora adecuada (Fernández-Espejo, 2000; Kalivas y Volkow., 2005).

La coraza del NAcc se relaciona con funciones límbicas, ya que tiene aferencias de la CPF, amígdala e hipocampo., y su centro se encarga de regular la conducta motora tanto en situaciones de ambiente nuevo, como en conductas de búsqueda en la ingesta de drogas (durante el comportamiento adictivo) además de su centro parten eferencias gabaérgicas hacia el globo pálido ventral del tálamo, y éste a su vez activa áreas motoras de la corteza (Fernández-Espejo, 2000; Kalivas y Volkow., 2005).

Una de tantas funciones que se pierden gradualmente durante el envejecimiento humano es la rapidez y precisión para ejecutar acciones motoras e intelectuales, se tiene un informe actual de un estudio en ratones con envejecimiento acelerado, en el que se sugiere que hay una correlación del envejecimiento con la actividad motora, la capacidad cognitiva, la emotiva, así como la regulación hacia arriba de los genes involucrados en aspectos inmunológicos del SNC, es decir, conforme aumenta el tiempo de vida, disminuyen estas

cuatro funciones de forma paralela (Bordner y cols., 2011) lo anterior es consecuencia del envejecimiento.

El envejecimiento puede ocasionar disminución de ACh en neuronas colinérgicas de los núcleos basales, así como disminución de la actividad de la AChT en hipocampo y áreas corticales (Gil y cols., 2000), pero no sólo en el envejecimiento, sino que además, el declive del sistema colinérgico está presente en áreas como la CPF e hipocampo, hecho considerado como una de las principales causas de demencia senil y “enfermedad de Alzheimer” (Buccafusco y Terry, 2004; Casu y cols., 2002; Rosenzweig y Barnes, 2003). Con base en lo anterior, y respecto a nuestros resultados, tanto el DON como la CBL aumentan la actividad motora administrándolos por separado, sin embargo, la combinación de ambos no tuvo efecto aditivo en esta prueba conductual, para el caso del grupo tratado con donepecilo, sugerimos que el aumento en la actividad motora se debió a la hiperactivación del sistema colinérgico a nivel de la corteza y el núcleo accumbens, de acuerdo con estudios que sustentan la hipótesis de que el tratamiento con DON ejerce efecto generalizado por activación funcional de ACh tanto a nivel central como periférico, (Hashimoto y cols., 2005; López-Pousa y cols., 2001; Zivin y Pregel, 2008).

Es un hecho que ante un ambiente novedoso, las entradas dopaminérgicas del AVT hacia el centro del núcleo accumbens aumentan, y la conducta motora ante ambiente nuevo aumenta por inhibición de las proyecciones gabaérgicas hacia el tálamo, y esta inhibición estimula excitadoramente a la corteza motora para ejecutar la locomoción *por lo tanto, al sobreactivarse el sistema colinérgico en mayor grado con el donepecilo, se supera la inhibición y entonces aumenta la excitabilidad de la corteza y de la amígdala, que proyectan hacia el NAcc por ende aumenta la locomoción* (Jones y cols., 1992).

En un estudio publicado en el 2005, muestran que, el donepecilo no tiene efecto sobre la hiperlocomoción inducida en un modelo de ratón tratado genéticamente MK-801 (modelo de esquizofrenia), (Csernansky y cols., 2005); sin embargo en ausencia de patología, otros autores en el 2004 observaron que, en primates no humanos envejecidos (saludables), el donepecilo mejora los porcentajes de precisión y retraso en la prueba DMTS (por sus siglas en inglés: Delayed Matching-to-Sample Task), concluyendo que: tanto animales (hembras y machos) jóvenes como viejos, mejoran el porcentaje de precisión con donepecilo, sólo que los viejos requirieron mayores dosis para igualar la mejoría de los jóvenes (Buccafusco y Terry, 2004), a este respecto, dado que la prueba DMTS requiere de movimientos motores

dirigidos, podemos decir entonces que donepecilo mejora la función motora en el envejecimiento normal y que, como proponen éstos autores, *es posible tratar con donepecilo los déficits en la precisión de los movimientos motores dirigidos, así como los cognitivos por envejecimiento, sin embargo, y de acuerdo con nuestros resultados, su posible combinación con cerebrolisina en ratón, no potencializa el efecto farmacológico.*

El efecto de la CBL administrada (5 ml/kg de peso) durante nueve semanas, a ratones de seis meses de edad (ratón en vías de involución celular) induce incremento significativo de la actividad motora frente al grupo control (Juárez y cols., 2011), nuestros resultados también denotaron el incremento de la actividad motora del grupo tratado con CBL frente al control, sin embargo para el grupo que se trató con ambos fármacos (DON+CBL), no se obtuvo el efecto aditivo que se esperaba es decir, sí aumenta la actividad motora pero no es mayor que con el DON o la CBL aplicados por separado. Al analizar tanto la coraza como el centro del NAcc, no encontramos efectos sobre la neuromorfología de las neuronas espinosas medianas en dichas regiones.

El mecanismo de acción propuesto para la CBL es análogo a la de los factores neurotróficos endógenos, ya que modifica una o más vías de señalización celular para proteger ante daño, contribuyendo además a la posterior recuperación funcional. Lo anterior se ha observado, por la mejoría en el desempeño de tareas cognitivas y de memoria espacial, aplicadas en modelos (murinos y humanos) de daño neuronal y envejecimiento, (Álvarez y cols., 2006; Álvarez y cols., 2011; Doppler y cols., 2008; Rockenstein y cols., 2007; Ubhi y cols., 2009). A este respecto, se ha generado la hipótesis del posible efecto de la cerebrolisina sobre la disminución de la hiperfosforilación de la proteína TAU, hecho observado en ratones transgénicos que desarrollan patología neurofibrilar y amiloidea; a través de la regulación de la actividad de la GSK3 (proteína sintasa quinasa involucrada en el crecimiento y maduración de las terminales nerviosas, así como en el proceso químico de la fosforilación de TAU), estos autores observaron además disminución significativa en la formación de marañas neurofibrilares y placas de amiloide con un tratamiento de 2.5 ml/kg i.p durante tres meses, aunado al incremento en la expresión de la pGSK3 β (forma inactiva de la GSK3) así como decremento en la expresión de pCDK5 (forma activa), (Ubhi y cols., 2009), sin duda lo anterior prueba el efecto funcional de cerebrolisina sin embargo, no queda claro en qué punto se modifica la vía de señalización para generar la disminución en los niveles de fosforilación, es necesario

completar esta información ya que se establecería con mayor precisión el mecanismo de acción de la droga.

En el año 2007 se detectaron por ELISA algunas de las neurotrofinas contenidas en la cerebrolisina, las cuales son: GDNF, CNTF, IGF-1, IGF-2, NT3, NT4, y LIF (Chen y cols., 2007) estos autores señalaron al efecto conjunto de todos los anteriores, para disminuir los niveles de FGF-2 (factor de crecimiento fibroblástico tipo 2) ya que se sabe que los niveles altos de este último, contribuyen a la disminución de la neurogénesis hipocámpica, fenómeno detectado durante el proceso neurodegenerativo en la EA, por lo que probablemente, el efecto terapéutico de CBL esté basado en alguna o todas estas vías aunadas a las aún no descritas, pero de hecho hasta el momento carecemos de evidencias suficientes para comprender bien cómo se genera mejoría en la conducta motora y respecto a los efectos plásticos, resulta más complejo comprenderlo porque esperábamos que se generara un efecto aditivo sin embargo no fue así.

Por otra parte y siguiendo con los hallazgos de Chen y colaboradores en el 2007, la presencia del IGF-1 en la cerebrolisina podría jugar una importante función en el efecto farmacológico de ésta droga, debido a que es un factor de crecimiento que tiene una participación central durante el desarrollo embrionario y en la homeóstasis del sistema nervioso en etapa adulta, lo anterior a través de mecanismos endocrinos, autocrinos, y paracrinos. Este factor también se asocia con la pérdida del sentido de la audición y la disminución de su concentración sérica en ratones y humanos con el paso de la edad, por lo cual al aplicar terapia recombinante de este factor se mejoró la audición en un modelo de ratón envejecido con déficit de audición (Murillo-Cuesta., 2011).

Se tiene evidencias de que el sistema de señalización del IGF-1 es también deficiente en ratones viejos (Muller y cols., 2001), a este respecto se ha probado el tratamiento con IGF-1 humano administrado a un modelo de envejecimiento acelerado en ratón (con desbalance entre IGF-1 y la hormona GH), el tratamiento generó retardo del envejecimiento, así como aumento de la longevidad de estos animales al restaurar el balance entre IGF-1 y la GH (Mariño y cols., 2010).

Otra neurotrofina presente en la cerebrolisina es el CNTF (factor neurotrófico ciliar, por sus siglas en inglés), el cual es importante en procesos de reparación neuronal, cabe mencionar que la concentración de CNTF en el SNC disminuye con el paso de la edad

(Guillet y cols., 1999) hecho que se relaciona con la denervación muscular que ocasiona déficits en la disminución de la fuerza muscular en el anciano. Aunado a lo anterior se sabe además que, el CNTF tiene efectos benéficos como tratamiento en un modelo de ratón transgénico Tg2576 de Alzheimer ya que mejoró la memoria en estos roedores, (García y cols., 2010). Cerebrolisina contiene también neurotrofinas como la NT4 y NT3, (Chen y cols., 2007), aunque en menores cantidades que CNTF, IGF-1, ó IGF-2, cabe destacar que NT3 es una molécula que tiene efectos fisiológicos similares a los del BDNF, ya que tiene funciones específicas en procesos mnemónicos asociados con enfermedades neurodegenerativas como EA, y EP promoviendo la sobrevivencia de poblaciones neurales específicas afectadas bajo éstas condiciones (Cunha y cols., 2010), de igual forma se le atribuye a NT3 cierta participación como promotora en la diferenciación de neuronas colinérgicas (Brodski y cols., 2000).

Es necesario recalcar que, al cortex prefrontal no sólo se le atribuyen funciones cognitivas y mnemónicas sino también se relaciona con el buen funcionamiento de los movimientos voluntarios así como en el aprendizaje de habilidades motoras, ya que los axones de las neuronas piramidales de la capa V en esta región, forman fibras de proyección hacia la médula espinal, el tálamo, ganglios basales, cerebelo, y tallo cerebral; cabe resaltar la enorme importancia de tipo límbico-cognitiva que recientemente se atribuye a dicha circuitería en la cual sus proyecciones pasan por regiones límbicas como corteza media pre-frontal, área ventral tegmental, hipocampo y amígdala cerebral, todo esto para evaluar correctamente la información, y así generar respuestas motoras adecuadas, de acuerdo con la información sensori-motora y emocional que haya entrado de inicio al circuito (Quiróz-Padilla y cols., 2010; Haegelen y cols., 2009; Attox y Nelson, 2007; 2006; Muñoz-Yunta y Palau-Baduell, 2004).

A este respecto es un hecho que las neuronas corticales de la CPF participan activamente en la consolidación de la memoria, razón por la cual, el efecto benéfico de la CBL sobre las funciones cognitivas es sobresaliente. Las neuronas piramidales de la CPF junto con las de corteza entorrinal e hipocampo disminuyen con el paso de la edad, aunque esta disminución no es significativa en condiciones normales, tampoco es requisito necesario para desarrollar la EA además se presenta reducción en el tamaño del soma, así como retracción del árbol dendrítico entre otras características, tanto para murinos, primates envejecidos y humanos envejecidos (Bano y cols., 2010; Kolb y cols.,1998;), además

resulta interesante el hecho de que éste fenómeno estructural se presenta en las primeras etapas sintomáticas de la EA en humanos (Morrison y Hof., 1997).

Por otra parte se sabe que en ratas de mediana y avanzada edad el proceso de envejecimiento reduce la capacidad plástica de las neuronas de la CmPF para adaptarse conductualmente a los cambios del medio ambiente (Bloss y cols., 2011), de acuerdo a lo anterior y a nuestros resultados, *la terapia combinada de cerebrolisina y donepecilo aplicada después de la madurez aumenta la plasticidad del árbol dendrítico en las piramidales tanto de la capa III como de la capa V.*

Como se demostró en años 90's "el mantenimiento, aumento o disminución cuantitativa de la longitud total de las dendritas neuronales se traduce en mantenimiento, aumento, o disminución en el número total de las sinapsis, independientemente de la densidad de espinas" (Kolb y cols., 1998), con respecto a nuestros resultados sobre la corteza prefrontal, concluimos que *el tratamiento combinado de ambos fármacos durante la etapa posterior a la madurez, ejerce efecto farmacológico aditivo dirigido al aumento de la comunicación sináptica en la corteza prefrontal (región encargada del buen funcionamiento de la memoria),* y se sabe además que este efecto positivo también se obtiene en condiciones patológicas, al aplicar el mismo tratamiento a pacientes humanos con EA, ya que ejerce mejoría cognoscitiva tras evaluarlos con la prueba neuropsicológica ADAS-cog a las 28 semanas de tratamiento (Álvarez y cols., 2011).

En el trabajo de Juárez y colaboradores de este 2011 proponen que, el tratamiento con cerebrolisina puede revertir los efectos motores y cognitivos del envejecimiento, nosotros coincidimos con esta conclusión además de que, la terapia combinada con donepecilo tiene efecto farmacológico aditivo sobre la corteza prefrontal y por lo tanto, *proponemos que: "la terapia combinada de donepecilo+cerebrolisina, aplicada durante la etapa adulta mantiene la arborización dendrítica que se pierde a nivel de la corteza prefrontal, ya que a partir del periodo adulto los seres humanos gradualmente presentan mayor susceptibilidad a los efectos deletéreos por envejecimiento,* por supuesto, esta propuesta podría ser un poco incipiente, ya que es preciso saber (entre otros factores) durante cuánto tiempo, y cuántas veces sería necesario aplicarlo a una persona madura en vías de entrar a la etapa senil, para así, evitar el deterioro cognitivo por la edad avanzada, y en el mejor de los casos, evitar la neurodegeneración progresiva.

La amígdala basolateral fue otra de las regiones que analizamos, específicamente las neuronas piramidales, en las cuales nosotros no registramos cambios morfológicos en los parámetros estudiados de longitud dendrítica y densidad de espinas. Se sabe por investigaciones previas que, la amígdala se comunica a través de eferencias con CPF, HV, y el NAcc a su vez, le llegan aferencias de CPF y el tálamo (Bouwmeester y cols., 2002), por lo que se encarga de la modulación de respuestas motoras y viscerales rápidas ante situaciones adversas, además se sabe que, las conexiones recíprocas que mantiene con la CPF también modulan la toma de decisiones en procesos emocionales (Martínez-Selva y cols., 2006; Pape y Pare, 2009).

El envejecimiento sobre las neuronas piramidales de la ABL causa un aumento progresivo de su arborización (efecto no influenciado por el sexo del animal) es decir, parece que el paso de la edad no afecta el buen funcionamiento de la ABL, lo que se sabe hasta ahora, es que puede ser una respuesta compensatoria por pérdida dendrítica en otras regiones como en la corteza o el tálamo (Ruvinov y cols., 2007), además en la rata macho vieja, se mantienen eficientes las interacciones entre el hipocampo y la ABL (Ruvinov y cols., 2007), por lo tanto, y de acuerdo con nuestros resultados, al encontrar mayores niveles de arborización en el tratamiento combinado en la CPF lo más lógico sería que las piramidales de la ABL también aumentarían su arborización en respuesta a la estimulación trófica (combinación CBL+DON), sin embargo no fue así ya que se mantuvo casi intacto el árbol dendrítico de las piramidales en la ABL, el NAcc, y el HV; hecho resultante para los tres grupos experimentales del presente reporte (DON, CBL, y DON+CBL).

Concluimos entonces que, tanto la monoterapia de las drogas por separado, como la terapia combinada de donepecilo+cerebrolisina en etapa de adulto mayor, mantiene estables los circuitos que tienen que ver con funciones emocionales y de aprendizaje tales como los establecidos por las piramidales de la AB, HV, y CPF.

En un modelo murino del “síndrome de Reet” la CBL recupera la pérdida del número de neuronas en hipocampo y corteza (Doppler y cols., 2008), de igual forma en otros modelos de neurodegeneración como EA se observa mejoría en las funciones cognitivas de animales y en humanos (Panisset y cols., 2001; Radzivil y Bashini, 2006; Rokenstein y cols., 2006; Tesseur y cols., 2006; Damulin y cols., 2008; Ladurner y cols., 2005; Riley y cols., 2006).

El efecto del donepecilo ante daño inducido en diversos modelos de neurodegeneración también tiene efectos positivos hacia la recuperación sináptica y funcional (Zivin y Pegrel, 2008; Knobloch y Mansuy, 2008; Álvarez y cols., 2006; Álvarez y cols., 2011).

Durante el proceso de envejecimiento normal se ha detectado declive de la “función respiratoria mitocondrial”, con su consecuente incremento de estrés oxidativo, durante este último proceso, se liberan especies reactivas al oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que son moléculas responsables de inducir daño neuronal; el aumento de estas ROS favorecen la oxidación de proteínas y el acúmulo de mutaciones dañinas en el ADN. Estos procesos moleculares, son los que detonan el proceso de envejecimiento, entonces el simple hecho de envejecer conlleva riesgo de sufrir algún tipo de neurodegeneración como el de la EA (Meissner, 2007; Mattson y Magnus, 2006; Chen-Lee y Huei-Wei, 2001; Mattson y Limke, 2005). Otra consecuencia del estrés es la per-oxidación de lípidos, que se incrementa bajo condiciones de estrés como en la hipoxia, isquemia cerebral, y en enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus (Mattson y cols., 2009), debido a que esta última es una enfermedad que tiene efectos crónicos de acidosis debido precisamente a la per-oxidación de lípidos por hipoglucemia en el ratón, se tienen reportes del efecto protector de CBL ya que impide éste tipo de reacciones oxidativas (Patockova y cols., 2003).

La espinogénesis en las neuronas de la corteza entorrinal e hipocampo (principalmente) disminuye significativamente en condiciones patológicas neurodegenerativas como en la EA (Penzes y cols., 2011; Knobloch y Mansuy, 2008), pero además se tienen reportes de que, durante el proceso de envejecimiento, también hay pérdida de espinas dendríticas (aunque no en mayor grado como en los procesos patológicos), observado tanto en humanos como en modelos animales de envejecimiento (Penzes y cols., 2011; Dimitriu y cols., 2010; Pérez-Cruz y cols., 2011; Duan y cols., 2003).

Nuestros resultados no evidenciaron efecto alguno sobre la densidad de espinas en ninguna de las regiones estudiadas, a excepción de que, en el HD CA1, el DON aumentó la densidad de espinas, en comparación con los demás grupos experimentales; sabemos que DON administrado por separado, aumenta la densidad de espinas en corteza prefrontal, hipocampo y núcleo accumbens de rata *Sprague dawley* con 10 y 12 meses de edad (Alcántara y cols., 2010), probablemente el DON no tuvo efecto en CPF y el NAcc, debido a que en el presente estudio, usamos ratones que oscilaron en los 7 meses de edad, aunque

existe un reporte en el que dieron a jóvenes humanos y sanos un tratamiento con donepecilo oral 5 mg/día en los que se observaron mejoría de la memoria episódica, y la de tipo visuoespacial, resultados basados en pruebas neuropsicológicas aplicadas después de tan sólo 90 min y 210 min de la ingesta del fármaco (Zaninotto y cols., 2009).

Pese a lo anterior hemos observado que, existen mayor número de reportes (ya citados anteriormente) del efecto de ambos fármacos en procesos con patología neurodegenerativa, *de hecho hasta ahora no hay reportes que puedan sustentar los mecanismos de los efectos tróficos de ambos medicamentos, tanto en “condiciones de envejecimiento normal” y “condiciones patológicas”, por lo pronto concluimos que en condiciones normales modulan, y en condiciones patológicas re-establecen las sinapsis.*

Aunado a todo lo que hasta ahora hemos discutido sobre ambas drogas se atribuye al donepecilo un “efecto de tipo trófico”, el cual se ha observado por su posible “efecto protector ante apoptosis inducida” en cultivos de tejido neuronal (Takada-Takatori y cols., 2009; De Bartolo y cols., 2009; Noh y cols., 2009; Takada-Takatori y cols., 2008; Takada-Takatori y cols., 2003), además de que re-establece la potenciación de largo plazo reprimida por el péptido β -amiloide 1-42 en el hipocampo de rata (Kapai y cols., 2010). A este respecto, insistimos en hacer notar que, a pesar de la evidencia de los efectos neuroprotectores de donepecilo ante daño neuronal, no se ha determinado el mecanismo molecular por el cual se llevan a cabo sin embargo, es posible atribuir de forma indirecta una posible estimulación trófica para re-establecer las sinapsis que se pierden por efecto del envejecimiento, lo anterior debido a que hay un reporte en el que se sugiere el posible aumento de los niveles séricos de BDNF por el donepecilo, en pacientes con EA de primera etapa (Leyhe y cols., 2008).

Por otra parte, se ha observado que, niveles altos de la enzima AChE se encuentran expresados en neuronas no colinérgicas del hipocampo durante etapas tempranas de desarrollo en los conos de crecimiento dendrítico, y también durante la regulación de formaciones sinápticas, esto es independiente de su acción catalítica (Dong y cols., 2004), por lo tanto la inhibición de esta enzima, puede inducir la reducción en el tamaño de las dendritas en neuronas del hipocampo durante estadios tempranos de su desarrollo (aunque este mecanismo de acción aún no es claro), respecto a lo anterior, podríamos entonces sugerir que es posible que DON haya contribuido a la disminución de la arborización y la longitud dendrítica total en el HD CA1 sin embargo, tenemos evidencias (Alcántara y cols.,

2010), de que el efecto es contrario en la aplicación de la monoterapia con donepecilo por lo tanto, sugerimos que hay una, o más reacciones de interacción que desconocemos y que arrojaron los resultados que obtuvimos.

En nuestro modelo no hay daño neuropatológico fibrilar, sino principios de envejecimiento celular, y tal vez en ratones transgénicos (modelo de EA) sí se encuentre algún efecto marcado hacia el incremento de la conducta motora, y la arborización por recuperación de neuronas en proceso neurodegenerativo, tal como ocurre en diversos modelos experimentales de patología neurodegenerativa (antes mencionados), en los cuales tanto el donepecilo como la cerebrolisina tienen un marcado efecto hacia la recuperación sináptica y la neuroprotección.

VIII. CONCLUSIONES

El tratamiento combinado de DON+CBL por nueve semanas, en ratones de siete meses:

- ✓ No generó efecto farmacológico aditivo sobre la actividad motora.
- ✓ Tuvo efecto farmacológico sólo a nivel de la corteza prefrontal aumentando la arborización, la longitud total y el orden dendrítico de sus neuronas piramidales.
- ✓ Disminuyó la arborización, la longitud total y el orden, en neuronas piramidales del HD CA1.
- ✓ No tuvo efecto sobre la neuromorfología de las regiones: VH CA1, GD, y Nacc.
- ✓ No tuvo efecto sobre la densidad de espinas dendríticas en ninguna de las regiones estudiadas.

IX.PERSPECTIVAS

- ✓ Aplicar el mismo diseño experimental a ratones transgénicos (con daño neurofibrilar), y con edad mayor a 7 meses (por ejemplo a los 18 meses) sería interesante, ya que nuestro modelo se refiere a la degeneración por involución, y no por acumulación de TAU o APP.
- ✓ Sumar a los parámetros a estudiar, la morfología de las espinas dendríticas ya que, nos daría más bases para interpretar lo que está sucediendo en la plasticidad sináptica de nuestro experimento.
- ✓ Es necesaria la investigación molecular de los efectos farmacodinámicos implicados en la interacción de ambas drogas ya que, el estudio de la morfología neuronal no es suficiente para determinar si es viable o no la aplicación a humanos de este tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta D, Brusco LI, Guglielmetti PF, Guerra M, Mena R, Nitrini R, De los Santos ZT, Ventura RL. (2011). *La enfermedad de Alzheimer, diagnóstico y tratamiento: una perspectiva latinoamericana*. Editorial Médica Panamericana. 3-11. México, D.F.
- Aguiar A, Eubig PA, Schantz SL. (2010). *Attention deficit/hyperactivity disorder: a focused overview for children's environmental health researchers*. *Environmental Health Perspectives*. 12:1646-1653.
- Akasofu S, Kimura M, Tosasa T, Sawada K, Ogura H. (2008). *Study of neuroprotection of donepezil, a therapy for Alzheimer's disease*. *Chemico Biological Interactions*. 175:222-226.
- Akasofu S, Sawada K, Kosasa T, Hihara H, Ogura H, Akaike A. (2008). *Donepezil attenuates excitotoxic damage induced by membrane depolarization of cortical neurons exposed to veratridine*. *European Journal of Pharmacology*. 588:189-197.
- Akasofu S, Kimura M, Kosasa T, Ogura H, Sawada K. (2006). *Protective effect of donepezil in primary-cultured rat cortical neurons exposed to N-methyl-D-aspartate (NMDA) toxicity*. *European Journal of Pharmacology*. 530:215-222.
- Akasofu S, Kosasa T, Kimura M, Kubota A. (2003). *Protective effect in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation*. *European Journal of Pharmacology*. 472:57-63.
- Alcántara F, Juárez I, Solís O, Martínez I, Camacho I, Masliah E, Mena R, Flores G. (2010). *Enhanced dendritic spine number of neurons of the prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens, in old rats after chronic donepezil administration*. *Synapse*. 64:786-793.
- Allegri RF, Harris P. (2001). *La corteza prefrontal en los mecanismos atencionales y la memoria*. *Revista de Neurología*. 5:449-453.
- Almaguer-Melián W, Bergado-Rosado JA. (2002). *Interacciones entre el hipocampo y la amígdala en procesos de plasticidad sináptica. Una clave para entender las relaciones entre motivación y memoria*. *Revista de Neurología*. 6:586-593.
- Alquicer G, Silva-Gómez AB, Peralta F, Flores G. (2004). *Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpubertal rats*. *Int. J. Developmental Neuroscience*. 22:103-111.
- Alquicer G, Morales-Medina JC, Quirión R, Flores G. (2008). *Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 35:179-187.
- Álvarez XA, Cacabelos R, Laredo M, Couceiro V, Sampedro C, Varela M, Corzo L, Fernández-Novoa L, Vargas M, Alexandre M, Linares C, Granizo E, Muresanu D, Moessler H. (2006). *A 24 week, double-blind, placebo-controlled study of three dosages of cerebrolysin in patients with wild mild to moderate Alzheimer's disease*. *European Journal of Neurology*. 13:43-54.
- Álvarez XA, Cacabelos R, Sampedro C, Couceiro V, Alexandre E, Vargas M, Linares C, Granizo E, García-Fantini M, Baurecht W, Doppler E, Moessler H. (2011). *Combination treatment in Alzheimer's disease: results of a randomized, controlled trial with cerebrolysin and donepezil*. *Current Alzheimer Research*. 5:583-591.
- Alvin VT, Callahan PM, Hall B, Webster SJ. (2011). *Alzheimer's disease and age-related memory decline (preclinical)*. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*. 99:190-210

- ▶ Amaral DG. (1979). *Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentate. Anatomy and Embryology.* 3:241-251.
- ▶ Amaral DG, Witter MP. (1989). *The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience.* 3:571-591.
- ▶ Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. (2007). *The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies).* 163:3-22.
- ▶ Ansari MA, Scheff SW. (2010). *Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. Journal Neuropathological Experimental Neurology.* 2:155-167.
- ▶ Arendt T. (2009). *Synaptic degeneration in alzheimer´s disease. Acta of Neuropathology.* 118:167-179.
- ▶ Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. (2007). *Neurogénesis en el cerebro adulto. Revista de Neurología.* 9:541-550.
- ▶ Attox AM, Nelson SB. (2007). *Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. Journal Neurophysiology.* 98:3330-3340.
- ▶ Bano D, Agostini M, Melino G, Nicotera P. (2010). *Ageing, neuronal connectivity and brain disorders: an unsolved ripple effect. Molecular Neurobiology.* 11:8164-8166.
- ▶ Bartrés-Faz ID, Junqué CC. (1999). *Alteración cognitiva en el envejecimiento normal: nosología y estado actual. Revista de Neurología.* 1:64-70.
- ▶ Beck H, Yaari Y. (2008). *Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. Nature.* 9:357-369.
- ▶ Bennazi F. (1999). *Mania associated with donepezil. Journal Psychiatry & Neuroscience.* 24:468-469.
- ▶ Billard JM. (2006). *Ageing hippocampal synaptic activity and magnesium. Magnetic Resonance.* 19:199-215.
- ▶ Bishop NA, Lu T, Yankner BA. (2010). *Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature.* 464:529-535.
- ▶ Bloss EB, Janssen WG, Ohm DT, Yuk FJ, Wadsworth S, Saardi KM, WcEwen BS, Morrison JH. (2011). *Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. The Journal of Neuroscience.* 3121:7831-7839.
- ▶ Bordner KA, Kitchen RR, Carlyle B, George ED, Mahajan MC, Mane SM, Taylor JR, Simen AA. (2011). *Parallel declines in cognition, motivation, and locomotion in aging mice: Association with immune gene upregulation in the medial prefrontal cortex. Experimental Gerontology.* 8:643-659.
- ▶ Bouwmeester H, Snapper J, Ronken E, Kruse CG, Van-Ree JM. (2003). *Effects of neonatal amygdala lesions on (125I) neurotensin binding in specific brain areas of adult rat. European Journal of Neurosciences.* 17:1319-1322.
- ▶ Brodski C, Schnurch H, Dechant G. (2000). *Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences.* 17:9683-9688.

- ▶ Buccafusco JJ, Terry AV Jr. (2004). Donepezil-induced improvement in delayed matching accuracy by young and old rhesus monkeys. *Journal of Molecular Neuroscience*. 24:85-91.
- ▶ Cacabelos R. (2007). Donepezil in Alzheimer's disease: from conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 3:303-333.
- ▶ Carretié L, López-Martín S, Albert J. (2010). Papel de la corteza prefrontal ventromedial en la respuesta a eventos emocionalmente negativos. *Revista de Neurología*. 4:245-252.
- ▶ Castro-Alamancos MA. (2003). Dinamismo talamocortical: ¿cómo se comunican el tálamo y la neocorteza durante los estados de procesamiento de información?. *Revista de Neurología*. 7:643-649.
- ▶ Castro-Sierra E, Ponce de León CF, Rivera PA. (2005). Neurotransmisores del sistema límbico I amígdala, primera parte. *Salud Mental*. 6:27-32.
- ▶ Casu MA, Wong TP, De-Koninck Y, Da-Silva AR, Cuello AC. (2002). Aging causes a preferential loss of Cholinergic innervations of characterized neocortical pyramidal neurons. *Cerebral Cortex*. 12:329-337.
- ▶ Chen H, Tung YC, Li B, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. (2007). Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis. *Neurobiology of aging*. 28:1148-1162.
- ▶ Chen-Lee H, Huei-Wei Y. (2001). Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology*. 2:231-244.
- ▶ Chung KA, Brenna M, Lobb JG, Horak FB. (2010). Effects of a central cholinesterase inhibitor on reducing falls in Parkinson disease. *Neurology*. 75:1263-1269.
- ▶ Crews L, Masliah E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 19:12-20.
- ▶ Csernansky JG, Martin M, Shah R, Bertchume A, Colvin J, Hongxin D. (2005). Cholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits induced by MK-801 in mice. *Neuropsychopharmacology*. 12:2135-2143.
- ▶ Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. (2010). A simple rol for BDNF in learning and memory?. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 1:1-14.
- ▶ Damulin IV, Roberkaya NN, Mkhitarian EA. (2008). Effects of cerebrolysin on moderate cognitive impairments in cerebral vascular insufficiency (a clinical-electrophysiological study). *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 6:639-645.
- ▶ De Bartolo P, Gelfo F, Mandolesi L, Foti F, Cutuli D, Petrosini L. (2009). Effects of chronic donepezil treatment and cholinergic deafferentation on parietal pyramidal neuron morphology. *Journal of alzheimer's Disease*. 17:177-191.
- ▶ Del Arco A, Mora F. (2009). Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system, interactions: implications for plasticity and psychiatric disorders. *Journal of Neural Transmission*. 116:941-952.
- ▶ Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*. 3:275-284.
- ▶ Dekosky ST. (2002). *Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer*. *Revista de Neurología*. 8:752-760.
- ▶ Dimitriu D, Hao J, Hara Y, Kaufmann J, Jansen WGM, Lou W, Rapp PR, Morrison JH. (2010). Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *The Journal of Neuroscience*. 22: 7507-7515.

- ▶ Dong H, Xiang YY, Farchi N, Ju W, Wu Y, Chen L, Wang Y, Hochner B, Yang B, Soreq H, Lu WY. (2004). Excessive expression of acetylcholinesterase impairs glutamatergic synaptogenesis in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*. 24:8950-8960.
- ▶ Doppler E, Rockenstein E, Ubhi K, Inglis C, Mante M, Adame A, Crews L, Hitzl M, Moessler H, Masliah E. (2008). Neurotrophic effects of cerebrolysin in the *Mecp2*^{308/y} transgenic model of Rett syndrome. *Acta Neuropathologica*. 116:425-437.
- ▶ Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR. (2003). Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cerebral Cortex*. 13:950-961.
- ▶ Fernández-Espejo E. (2000). ¿Cómo funciona el núcleo accumbens?. *Revista de neurología*. 9: 845-849.
- ▶ Ferreri F, Agbokou C, Gauthier S. (2006). Cognitive disfunctions in schizophrenia: potential benefits of cholinesterase inhibitor adjunctive therapy. *Journal of Psychiatry Neuroscience*. 6:369-376.
- ▶ Fiala JC, Feinberg M, Peters A, Barbas H. (2007). Mitochondrial degeneration in dystrophic neurites of senile plaques may lead to extracellular deposition of fine filaments. *Brain Structural Function*. 212:195-207.
- ▶ Flores G, Alquicer G, Silva-Gómez AB, Zaldivar G, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK. (2005). Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and núcleo accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*. 133:463-470.
- ▶ Flores G, Wood G, Liang JJ, Quirion R, Srivastava LK. (1996). Enhanced amphetamine sensitivity and increased expression of dopamine D₂ receptors in post pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*. 16:7366-7375.
- ▶ Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. (2001). Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *The Journal Comparative Neurology*. 432:307-328.
- ▶ Fuster JM. (2001). The prefrontal cortex- an update: time is of the essence. *Neuron*. 30:319-333.
- ▶ García P, Youssef I, Utvik JK, Florent-Bécharde S, Barthélémy V, Malaplate-Armand C, Kriem B, Stenger C, Koziel V, Olivier JL, Escanye MC, Hanse M, Allouche A, Desbène C, Frances TY, Bjerkvig R, Oster T, Niclou SP, Pillot T. (2010). Ciliary Neurotrophic Factor Cell-Based Delivery Prevents Synaptic Impairment and Improves Memory in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 22: 7516-7527.
- ▶ García G, Vélez C, Jiménez M. (2001). El β -Amiloid modulator de inflamación en la enfermedad de Alzheimer. *latreia*. 1:73-85.
- ▶ Gendron TF, Petrucelli L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*. 13:1-19.
- ▶ Gibb R, Kolb B. (1998). A Method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*. 79:1-4.
- ▶ Gil GP. (2000). Bases fisiológicas del envejecimiento cerebral. *Revista Multidisciplinaria de Gerontología*. 2:66-91.
- ▶ Gómez-Pinilla F. (2008). Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nature*. 9:568-578.

- ▶ González Fraguela ME, Robinson Agramante MDA, Serrano Sánchez T, Libre JJ. (2004). Indicadores de estrés oxidativo e inmunológico en pacientes con enfermedad de Alzheimer. *Archivos de Neurociencias*. 1:3-10.
- ▶ Groenewegen HJ, Uylings HB. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progresion Brain Research*. 126:3-28.
- ▶ Guillet C, Auguste P, Mayo W, Kreher P, Gascan H. (1999). Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *The Journal of Neuroscience*. 4:1257-1262.
- ▶ Haeglelen C, Rouaud T, Darnault P, Morandi X. (2009). The subthalamic nucleus is a key-structure of limbic basal ganglia functions. *Medical Hypotheses*. 72:421-426.
- ▶ Haines D. (2003). *Principios de neurociencias*. Ed 2°. Elsevier Science. 490-509. USA.
- ▶ Hamann SB, Ely TD, Grafton ST, Kilts CD. (1999). Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nature Neuroscience*. 3:289-293.
- ▶ Hartbauer M, Hutter-Paier B, Skofitsch G, Windisch M. (2001). Antiapoptotic effects of the peptidergic drug cerebrolysin on primary cultures of embryonic chick cortical neurons. *Journal of Neural Transmission*. 108: 459-473.
- ▶ Hartbauer M, Hutter-Paier B, Windisch M. (2001). Effects of Cerebrolysin on the outgrowth and protection of processes of cultured brain neurons. *Journal of Neural Transmission*. 108: 581-592.
- ▶ Hashimoto M, Kasui H, Matsumoto K, Nakano Y, Yasuda M, Mori E. (2005). Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease?. *The American Journal of Psychiatry*. 162:676-682.
- ▶ Heimer L. (2004). Un Nuevo marco anatómico para los trastornos neuropsiquiátricos y el abuso de sustancia. *The American Journal of Psychiatry Ed Esp*. 7:1-14.
- ▶ Heinz A, Beck A, Grusser SM, Grace AA, Wrase J. (2008). Identifying the neural circuitry of alcohol craving and relapse vulnerability. *Addiction Biology*. 1:108-118.
- ▶ Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L, Shepard PD. (2008). Habenula- crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *The Journal of Neuroscience*. 46:11825-11829.
- ▶ Hongxin D, Csernansky CA, Martin MV, Bertchume A, Vallera D, Csernansky JG. (2005). Acetylcholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Psychofarmacology*. 181:145-152.
- ▶ Howard RJ, Juszczak E, Ballard CG, Bentham P, Brown RG, Bullock R, Burns AS, Holmes C, Jacoby R, Jhonson T, Knapp M, Lindesay J, O'Brien JT, Wilcock G, Katona C, Jones RW, DeCesare J, Rodger M. (2007). Donepezil for the treatment of agitation in Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. 14:1382-1392.
- ▶ Jian P, Jian M, wei D, Min C X, Yong X. (2004). Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chinese Medicine*. 117:161-1164.
- ▶ Johnson FB, Sinclair DA. (1999). Molecular biology of aging. *Cell*. 96:291-302.
- ▶ Jones GH, Hernández TD, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. (1992). Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacological Biochemistry Behavioural*. 43:17-35.
- ▶ Juárez I, Silva-Gómez AB, Peralta F, Flores G. (2003). Anoxia at birth induced hyperresponsiveness to amphetamine and stress in postpubertal rats. *Brain Research*. 992:281-287.

- ▶ Juárez I, González DJ, Mena R, Flores G. (2011). The chronic administration of cerebrolysin induces plastic changes in the prefrontal cortex and dentate gyrus in aged mice. *Synapse*. 11:1128-1135.
- ▶ Juárez I, Gratton A, Flores G. (2008). Ontogeny of altered dendritic morphology in the rat prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens following cesarean delivery and birth anoxia. *The Journal of Comparative Neurology*. 507:1734-1747.
- ▶ Kabaso D, Coskren PJ, Henry BI, Hof PR, Wearne SL. 2009. The electrotonic structure of pyramidal neurons contributing to prefrontal cortical circuits in macaque monkeys is significantly altered in aging. *Cerebral Cortex*. 19:2248-2268.
- ▶ Kalivas PW, Volkow ND: *Fundamentos neurales de la adicción*. (2005). una afección de la motivación y de la capacidad de elección. *The American Journal of Psychiatry*. 8:577-587.
- ▶ Kapai NA, Solntseva EI, Skrebetskii VG. (2010). Donepezil eliminates suppressive effects of β -amyloid peptide (1-42) on long-term potentiation in the hippocampus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1:33-36.
- ▶ Klarner A, Koch M, Schnitzler HU. (1998). Induction of Fos-protein in the forebrain and disruption of sensorimotor gating following N-methyl-D-aspartate infusion into the ventral hippocampus of the rat. *Neuroscience*. 84:443-452.
- ▶ Knobloch M, Mansuy IM. (2008). Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*. 37:73-82.
- ▶ Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Wetzel EB. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 9:505-517.
- ▶ Kolb B, Forgie M, Gibb R, Gorny G, Rowntree S. (1998). Age, experience and the changing brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2:143-159.
- ▶ Kotani S, Yamauchi T, Teramoto T, Ogura H. (2008). Donepezil an acetylcholinesterase inhibitor, enhances adult hippocampal neurogenesis. *Chemico Biological Interactions*. 175:227-230.
- ▶ Kume T, Sugimoto M, Takada Y, Yamaguchi T, Yonezawa A, Katsuki H, Sugimoto H, Akaike K. (2005). Up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors by central-type acetylcholinesterase inhibitors in rat cortical neurons. *European Journal of Pharmacology*. 527:77-85.
- ▶ Ladurner G, Kalvach P, Moessler H. (2005). Neuroprotective treatment with cerebrolysin in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. *The Journal of Neural Transmission*. 112:415-428.
- ▶ Laferla FM, Kim N, Oddo G, Oddo S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature*. 8:499-509.
- ▶ Lamberts SWJ, Van den Beld AW, Van der Lely AJ. (1997). The endocrinology of aging. *Science*. 278:419-424.
- ▶ Lamour Y, Bassant MH, Potier B, Billard JM, Dutar P. (1994). Aging of memory mechanisms. *C R séances Soc Biol Fil*. 188:469-486.
- ▶ Lanctot KL, Herrmann N. (2004). Review: donepezil improves cognitive and global function in people with mild to moderate Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 19:624-633.

- ▶ Leonard BE. (2004). *Pharmacotherapy in the treatment of Alzheimer's disease: and update. World Psychiatry. 2:84-88.*
- ▶ Leyhe T, Stransky E, Eschweiler GW, Buchkremer G, Laske C. (2008). *Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early Alzheimer's disease. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience. 258:124-128.*
- ▶ López-Pousa S, Bermejo-Pareja F, Frank A, Hernández F, León T, Rejas-Gutiérrez J. (2010). *Efecto del donepecilo comparado con el tratamiento convencional en la función cognitiva y el rendimiento del paciente en una cohorte prospectiva de pacientes con enfermedad de alzheimer tratados en la práctica clínica habitual en España. Revista de Neurología. 10:577-588.*
- ▶ López-Pousa S, Vilalta FJ, Garre OA, Turon EM, Lozano GM, Hernández FC, Fajardo T, Cruz RMM. (2001). *Eficacia del donepezilo sobre diversas funciones cognitivas durante 12 meses en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Neurología. 8:342-347.*
- ▶ Luebke JI, Weaver CM, Rocher AB, Rodríguez A, Crimins JL, Dickstein DL, Wearne SL, Hof PR. (2010). *Dendritic vulnerability in neurodegenerative disease: insights from analyses of cortical pyramidal neurons in transgenic mouse models. The Brain Structure Function. 214:181-199.*
- ▶ Luna MJ, Fuentes P, Chan HN, Fong MD, Zamudio S, Fidel DC, Marco M, Mena R. (2010). *Nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer potencialidad de los factores neurotróficos. Revista Mexicana de Neurociencias. 1:39-45.*
- ▶ Malin EL, MacGaugh JL. (2006). *Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. Proceedings of the National Academy of Sciences. 103:1959-1963.*
- ▶ MacGaugh JL. (2004). *The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. Annual Review Neuroscience. 27:1-28.*
- ▶ Mariño G, Ugalde AP, Fernández AF, Osorio FG, Fueyo A, Freije JMP, Otín-López C. (2010). *Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 107:16268-16273.*
- ▶ Mesulam MM, Geula C. (1988). *Acetylcholinesterase-rich pyramidal neurons in the human neocortex and hippocampus: absence at birth, development during the life span, and dissolution in Alzheimer's disease. Annals of Neurology. 24:765-773.*
- ▶ Martínez-Selva JM, Sánchez-Navarro JP, Bechara A, Román F. (2006). *Mecanismos cerebrales de la toma de decisiones. Revista de Neurología. 7:411-418.*
- ▶ Martínez-Téllez IR, Hernández-Torrez E, Gamboa C, Flores G. (2009). *Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. Synapse. 63: 794-804.*
- ▶ Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. (2008). *Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. Neuron. 60:748-766.*
- ▶ Mattson MP, Wan R. (2008). *Neurotrophic factors in autonomic nervous system plasticity and dysfunction. Neuromolecular Medical. 10:157-168.*

- ▶ Mattson MP. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 430:631-639.
- ▶ Mattson MP, Magnus T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature*. 7:278-294.
- ▶ Mattson MP, Limke TL. (2005). *Developmental neurobiology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Ed. 4°. 349-364. New York.
- ▶ Mattson MP. (2009). Roles of the lipid peroxidation product-4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology*. 10:625-633.
- ▶ Meissner C. (2007). Mutations of mitochondrial DNA-cause or consequence of the ageing process?. *Z Gerontol Geriat*. 40:325-333.
- ▶ Moris G, Vega J A. (2003). Factores neurotróficos: fundamentos para su aplicación clínica. *Revista de Neurología*. 18:18-28.
- ▶ Morrison JH, Hof PR. (1997). Life and Death of Neurons in the Aging Brain. *Science*. 278:412-419.
- ▶ Mucke L. (2009). Alzheimer's disease. *Nature*. 461:895-897.
- ▶ Mueller SG, Schuff N, Weiner MW. (2006). Evaluation of treatment effects in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases by MRI and MRS. *Biomedical*. 19:655-668.
- ▶ Muller AP, Fernandez AM, Haas C, Zimmer E, Portela LV, Torres-Alemán I. (2011). Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Molecular Cell of Neuroscience*. Artículo en prensa.
- ▶ Muñoz-Yunta JA, Palau-Baduell M. (2004). Ontogenia de la autoconciencia. Cómo se construye el cerebro cognitivo. *Revista de Neurología*. 1:3-8.
- ▶ Murillo-Cuesta S, Rodríguez-De la Rosa L, Cediell R, Lassaletta L, Varela-Nieto I. (2011). The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 11:1-17.
- ▶ Nieto-Sampedro M. (2003). Plasticidad neuronal. *Mente y cerebro*. 4:72-80.
- ▶ Noh MY, Koh SH, Kim Y, Kim HY, Cho GW, Kim SH. (2009). Neuroprotective effects of donepezil through inhibition of GSK-3 activity in amyloid- β -induced neuronal cell death. *The Journal of Neurochemistry*. 108:1116-1125.
- ▶ Panisset M, Gauthier S, Moessler H, Windisch M. (2001). Cerebrolysin in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with a neurotrophic agent. *The Journal of Neural Transmission*. 109:1089-1104.
- ▶ Pape JC, Pare D. (2009). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction, of conditioned fear. *Physiological Research*. 2:419-463.
- ▶ Patockova J, Krsiak, P M, Tumova E. (2003). Cerebrolysin Inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. *Physiological Research*. 52:455-460.
- ▶ Paxinos G, Franklin KBJ. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. Ed 2 . Sydney, Australia.

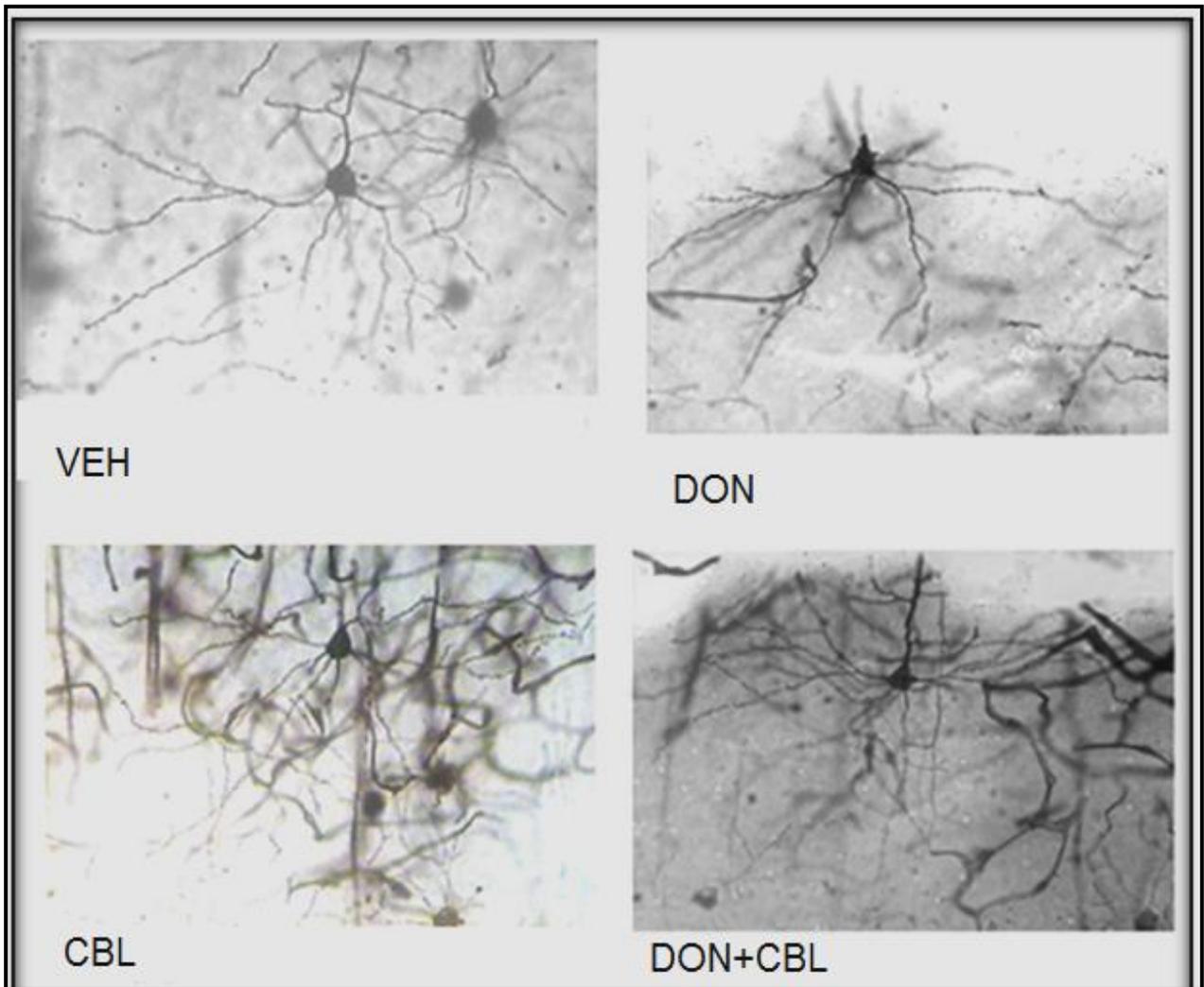
- ▶ *Pedroso II, Aguilar RA, Bringas VL, Álvarez SM, Álvarez GL, Díaz DFA, Padron SA. (2008). Necesidad de Neuroprotección en la enfermedad de Parkinson. Revista Mexicana de Neurociencia. 4:298-302.*
- ▶ *Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nature Neurosciences. 14:285-293.*
- ▶ *Pérez-Cruz C, Nolte MW, Gaalen MMV, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, Kirchhoff F, Ebert AU. (2011). Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of alzheimer's disease. The Journal of Neuroscience. 10: 3926-3934.*
- ▶ *Portera-Sánchez A. (2002). Cajal y el cerebro plástico. Revista Española de Patología. 4:367-372.*
- ▶ *Plosker GL, Gauthier S. (2009). Cerebrolysin (Renacenz) revision de su uso en la demencia. Drugs Aging. 11:893-915.*
- ▶ *Puig MV, Celada P, Artigas F. (2004). Control serotoninérgico de la corteza prefrontal. Revista de Neurología. 6:539-547.*
- ▶ *Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, MacNamara JO, Williams SM. (2004). Neuroscience. Sinauer Associates, Inc. Ed 3°. 733-753. U.S.A.*
- ▶ *Quiróz-Padilla MF, Martí-Nicolovius M, Guillazo-Blanch G. (2010). Núcleos intralaminares posteriores del tálamo y procesos cognitivos. Revista de Neurología. 4:217-225.*
- ▶ *Radzivil MG, Bashina VM. (2006). An effect of long-term cerebrolysin therapy in combination with neuroleptics on behavioral and cognitive disturbances in endogenous childhood autism. Zh Nevrol Psikhiatr Im S Korsakova. 2:21-25.*
- ▶ *Rajmohan V, Mohandas E. (2007). The limbic System. Indian J Psychiatry. 2:132-139.*
- ▶ *Ramírez VIR, Mena LR, Luna J. (2000). Diagnóstico molecular y neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Revista Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. 4:15-22.*
- ▶ *Ranga RKK, Cecil CH, Murali DP, Wintzer J, Weisler R, Yu X, Perdomo C, Leni RJ, Rogers S. (2003). Randomized, placebo-controlled trial of the effects of donepezil on neuronal markers and hippocampal volumes in Alzheimer's disease. The American Journal of Psychiatry. 160:2003-2011.*
- ▶ *Rylett RJ, Williams LR. (1994). Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. Trends in Neuroscience. 17:486-490.*
- ▶ *Riley C, Hutter-Paier B, Windisch M, Doppler E, Moessler H, Wronski R. (2006). A peptide preparation protects cells in organotypic brain slices against cell death after glutamate intoxication. The Journal of Neural Transmission. 113:103-110.*
- ▶ *Rockenstein E, Mante M, Adame A, Crews L, Moessler H, Masliah E. (2007). Effects of Cerebrolysin™ on neurogenesis in an APP transgenic model of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 113:265-275.*
- ▶ *Ropper AV. (2005). Principios de Neurología. Mc Graw-Hill Interamericana. Ed 6°. 530-540. España.*

- ▶ Rosenzweig ES, Barnes CA. (2003). *Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. Progress in Neurobiology.* 69:143-179.
- ▶ Rubinow MJ, Drogos LL, Juraska JM. (2007). *Age-related dendritic hypertrophy and sexual dimorphism in rat basolateral amygdala. Neurobiol Aging.* 1:137-146.
- ▶ Ruiz-Torres A, Hofecker G. (2003). *Marcadores biológicos del envejecimiento. Rev Esp Geriatrics & Gerontology.* 6:369-73.
- ▶ Saper CB. (2000). *Hypothalamic connections with the cerebral cortex, cognition, emotion and autonomic responses: the integrative role of the prefrontal cortex and limbic structures. Progress in Brain Research.* 126:39-48.
- ▶ Sarter M, Parikh V. (2005). *Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. Nature.* 6:48-56.
- ▶ Shen H, Kihara T, Hongo H, Wu X, Kem W, Shimohama S, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. (2010). *Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors. British Journal of Pharmacology.* 161:127-139.
- ▶ Shigeta M, Homma A. (2001). *Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. CNS Drug Reviews.* 4:353-368.
- ▶ Sholl DA. (1953). *Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices on the cat. The Journal Anatomic.* 87:387-406.
- ▶ Soriano-Mas C, Guillazo-Blanch G, Redolar-Ripoll DA, Torras-García M, Vale-Martínez A. (2007). *Fundamentos de neurociencias. Editorial UOC.* 300-316.
- ▶ Spruston N. (2008). *Piramidial Neurons: Dendritic structure and synaptic integration. Nature Reviews.* 9:206-220.
- ▶ Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y, Ohgi Y, Niidome T, Fujii T, Sugimoto H, Akaike A. (2009). *Functional changes induced by long-term stimulation of nicotinic acetylcholine receptors. Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 3:318-324.
- ▶ Takada-Takatori Y, Kume T, Sugimoto H, Akaike Izumi Y, Niidome T, Fujiii T. (2008). *Mechanism of neuroprotection by donepezil pretreatment in rat cortical neurons chronically treated with donepezil. J Journal of Neuroscience Research.* 86:3575-3583.
- ▶ Takada-Takatori Y, Yonezawa A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Sugimoto H, Akaike A. (2003). *Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate in rat cortical neurons. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2:772-777.
- ▶ Terry AV, Buccafusco JJ. (2003). *The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. Perspectives in pharmacology.* 306:821-827.
- ▶ Tesseur I, Zou K, Esposito L, Bard F, Berber E, Van Can J, H Lin A, Crews L, Tremblay P, Mucke L, Masliah E, Wyss-Coray T. (2006). *Deficiency in neural TGF- β signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. The Journal of Clinical investigation.* 116:3060-3069.
- ▶ Torras IM, Portell I, Morgado I. (2001). *La amígdala: implicaciones funcionales. Revista de Neurología.* 5:471-476.

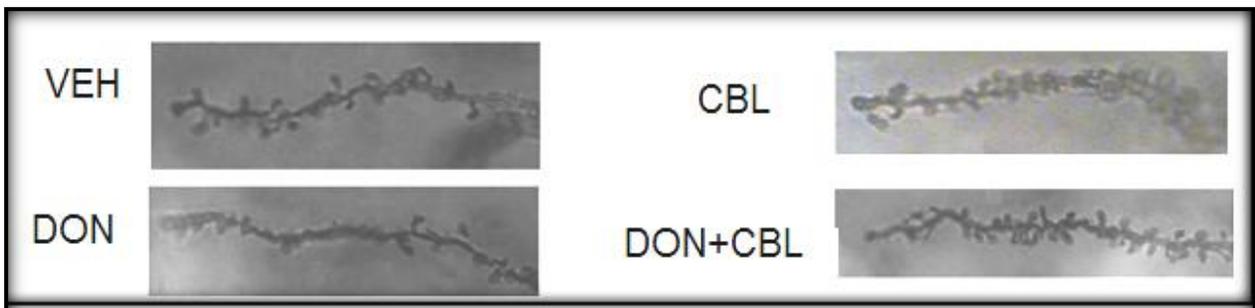
- ▶ Tresguerres JAF. (2005). *Fisiología Humana*. Mc Graw-Hill Interamericana. Ed 3°. 1148-1162. España.
- ▶ Ubhi K, Rockenstein E, Doppler E, Mante M, Adame A, Patrick C, Trejo M, Crews L, Paulino A, Moessler H, Masliah E. (2009). Neurofibrillary and neurodegenerative pathology in APP-transgenic mice injected with AAV2-mutant TAU: neuroprotective effects of Cerebrolysin. *Acta Neuropathologic*. 117:699-712.
- ▶ Vallone D, Picetti R y Borrelli E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Review*. 24:125-132.
- ▶ Vertes RP. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*. 142:1-20.
- ▶ Viggiano D, Vallone D, Ruocco LA, Sadile AG. (2003). Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Review*. 27:683-689.
- ▶ Witter MP, Amaral DG. (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *The Journal of Comparative Neurology*. 3:437-459.
- ▶ Wong TP, Marchese G, Casu MA, Dasilva AR, Cuello AC, Koninck Y. (2000). Loss of presynaptic and postsynaptic structures is accompanied by compensatory increase in action potential-dependent synaptic input to layer V neocortical pyramidal neurons in aged rats. *The Journal of Neuroscience*. 22:8596-8606.
- ▶ Wu WW, Oh MM, Disterhoft JF. (2002). Aged-related biophysical alterations of hippocampal pyramidal neurons: implications for learning and memory. *Ageing Research Reviews*. 1:181-207.
- ▶ Yin L, Jeong YM, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR, Mamounas L, Lyons WE, Blue ME, Lee MK. (2008). Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 28:13805-13814.
- ▶ Zhang Y, Kurup P, Xu J, Carty N, Fernández SM, Nygaard HB, Pittenger C, Greengard P, Strittmatter SM, Nairn AC, Lombroso PJ. (2010). Genetic reduction of striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP) reverses cognitive and cellular deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:1-6.
- ▶ Zivin M, Pregel JP. (2008). El tratamiento prolongado con donepecilo, aumenta la expresión de acetilcolinesterasa en el sistema nervioso central. *Psychiatry Danub*. 20:168-173.
- ▶ Zaninotto ALC, Bueno OFA, Pradella-Hallinan M, Tufik S, Rusted J, Stough C, Pompéia S. (2009). Acute cognitive effects of donepezil in young, healthy volunteers. *Human Psychopharmacology*. 24:453-464.

Fotomicrografías

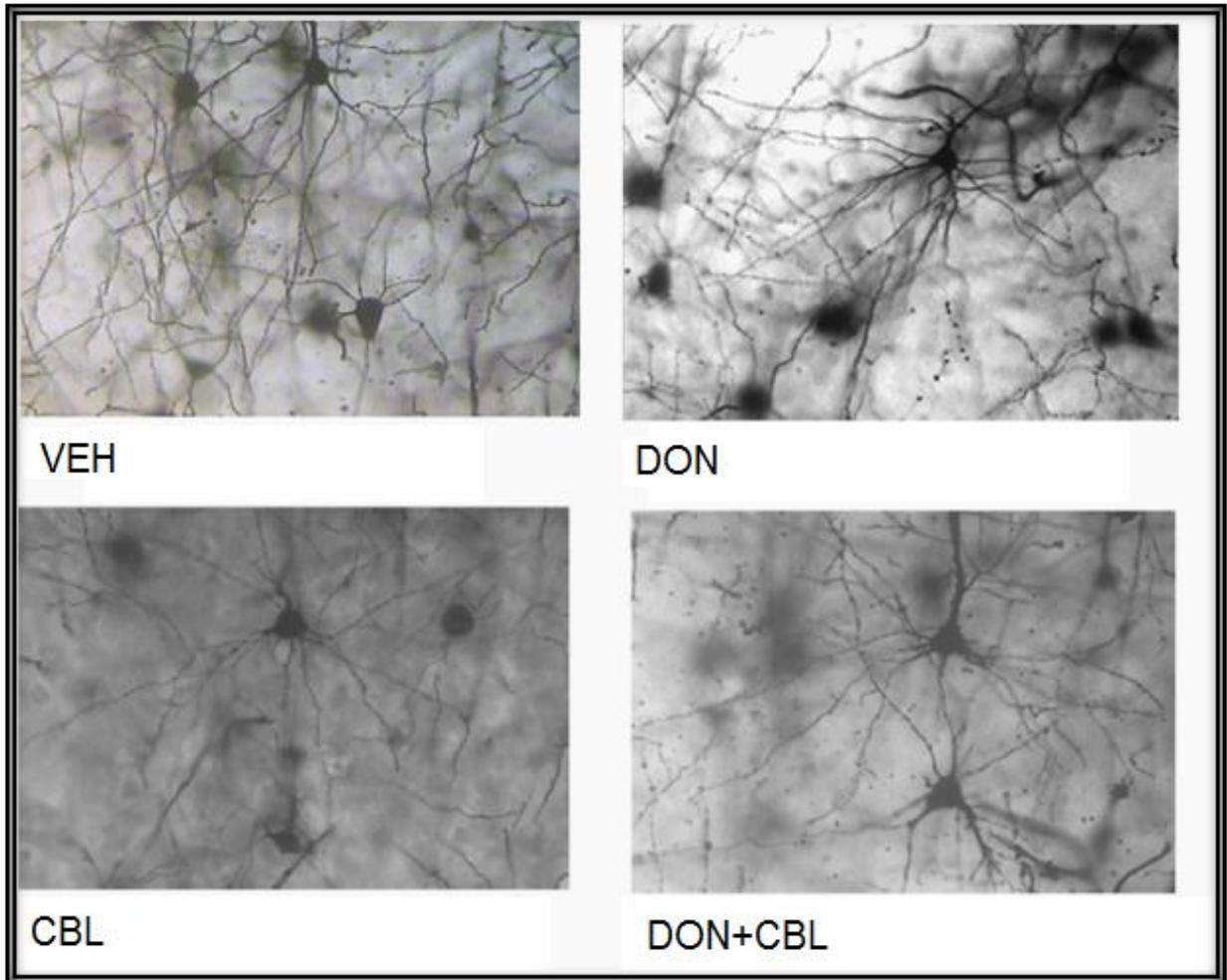
F1. Neuronas piramidales de la corteza media prefrontal capa III (20µm).



F2 Espinas distales en neuronas piramidales de la CmPF capa III (5µm)



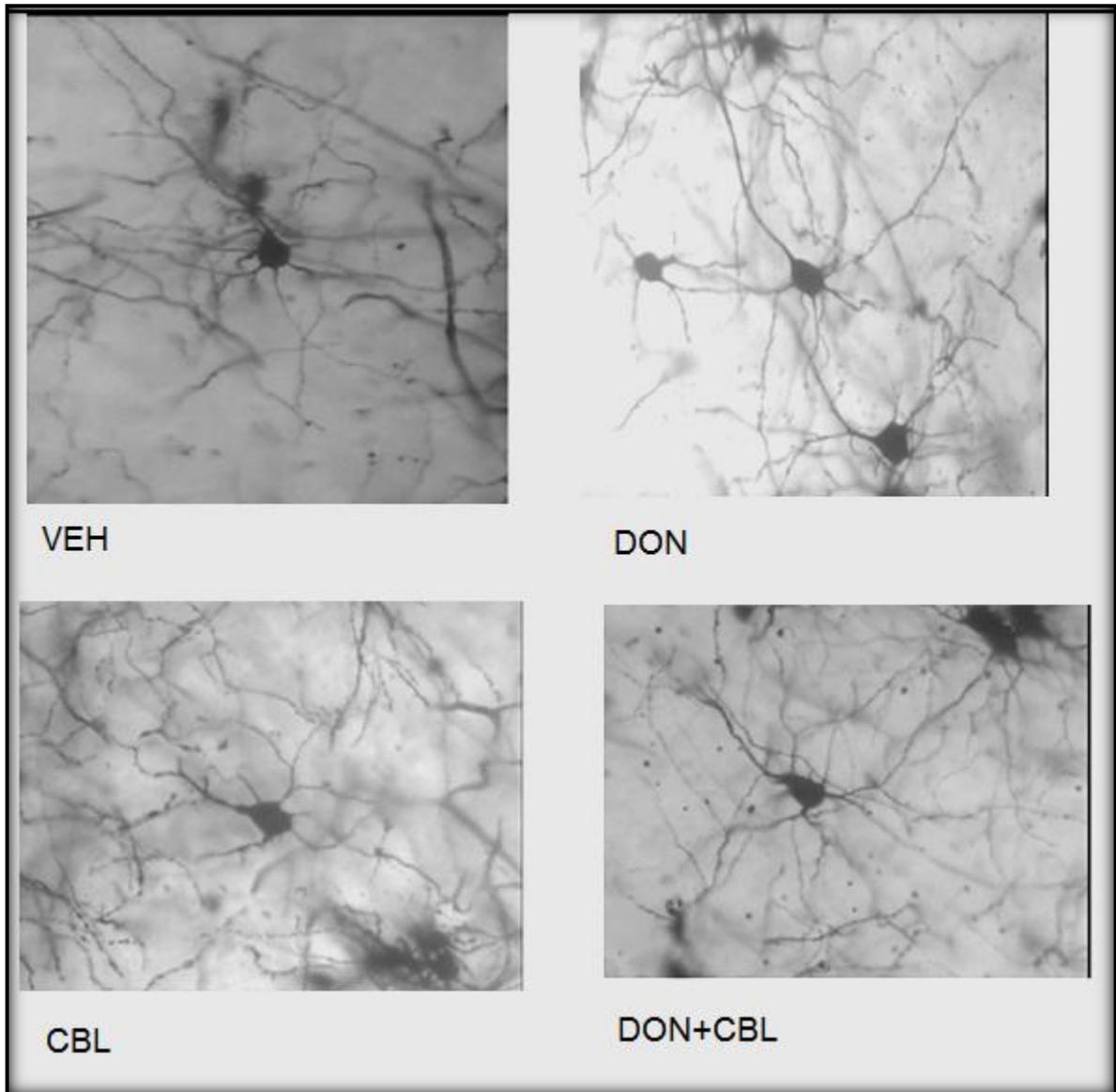
F3. Neuronas piramidales en la corteza prefrontal capa V (20µm)



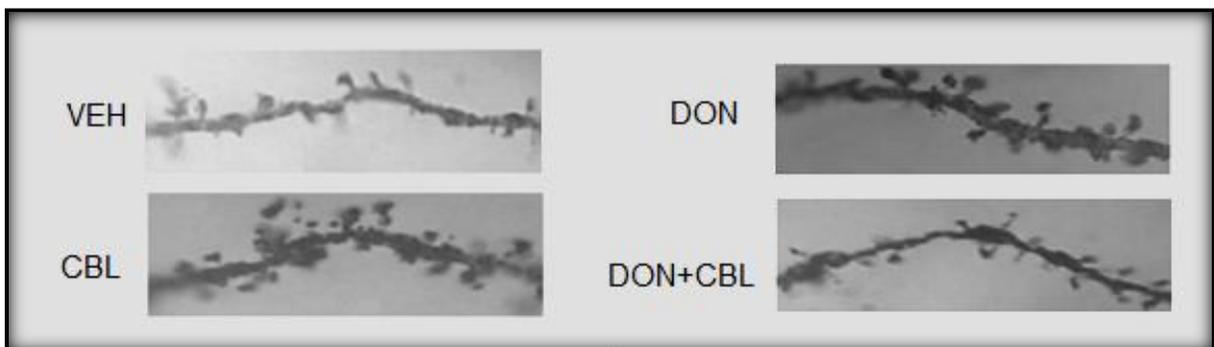
F4 Espinas distales en neuronas piramidales de CmPF capa V (5µm)



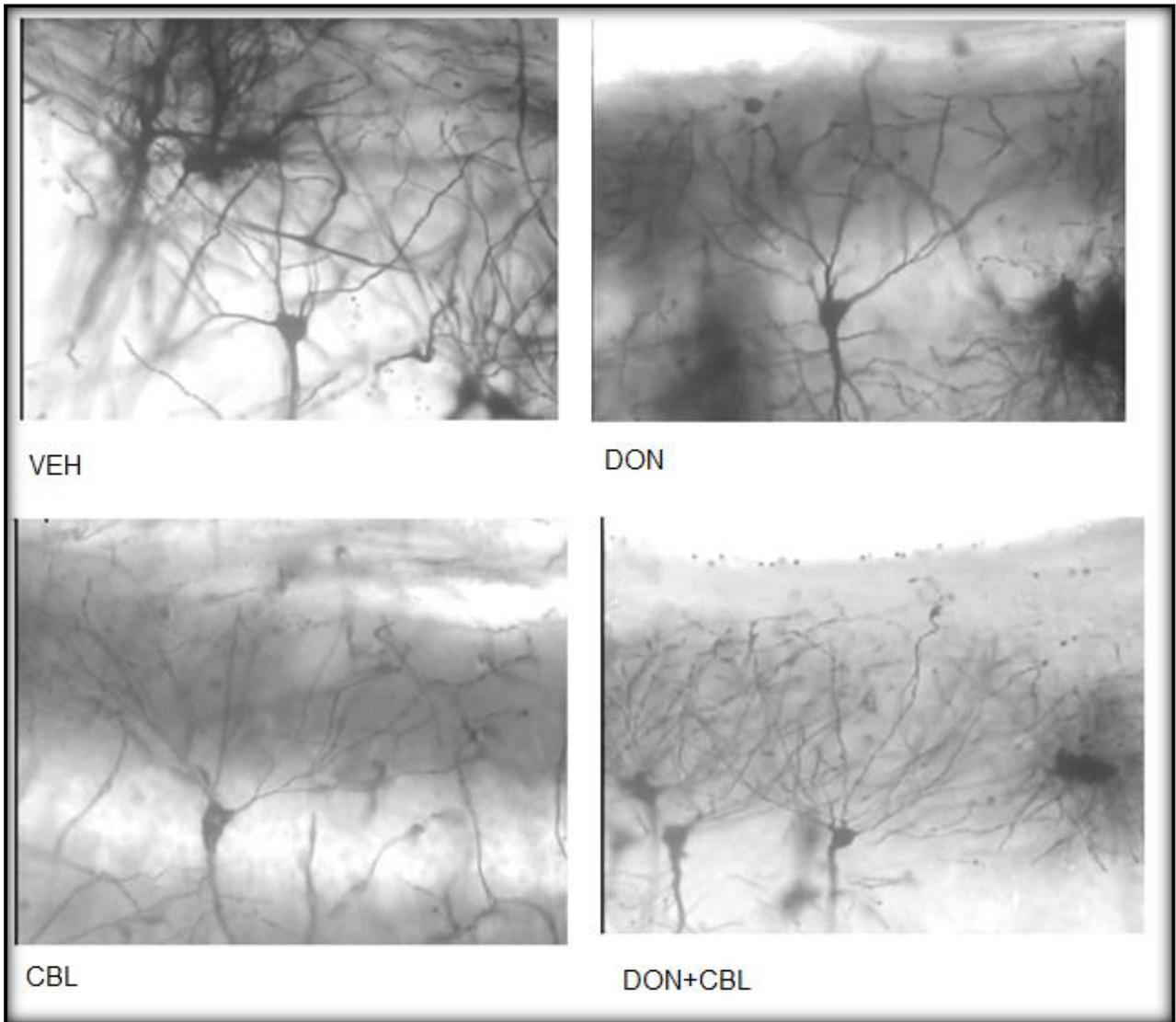
F5. Neuronas piramidales de amígdala basolateral (20µm)



F.6. Espinas distales en neuronas piramidales de ABL (5µm)



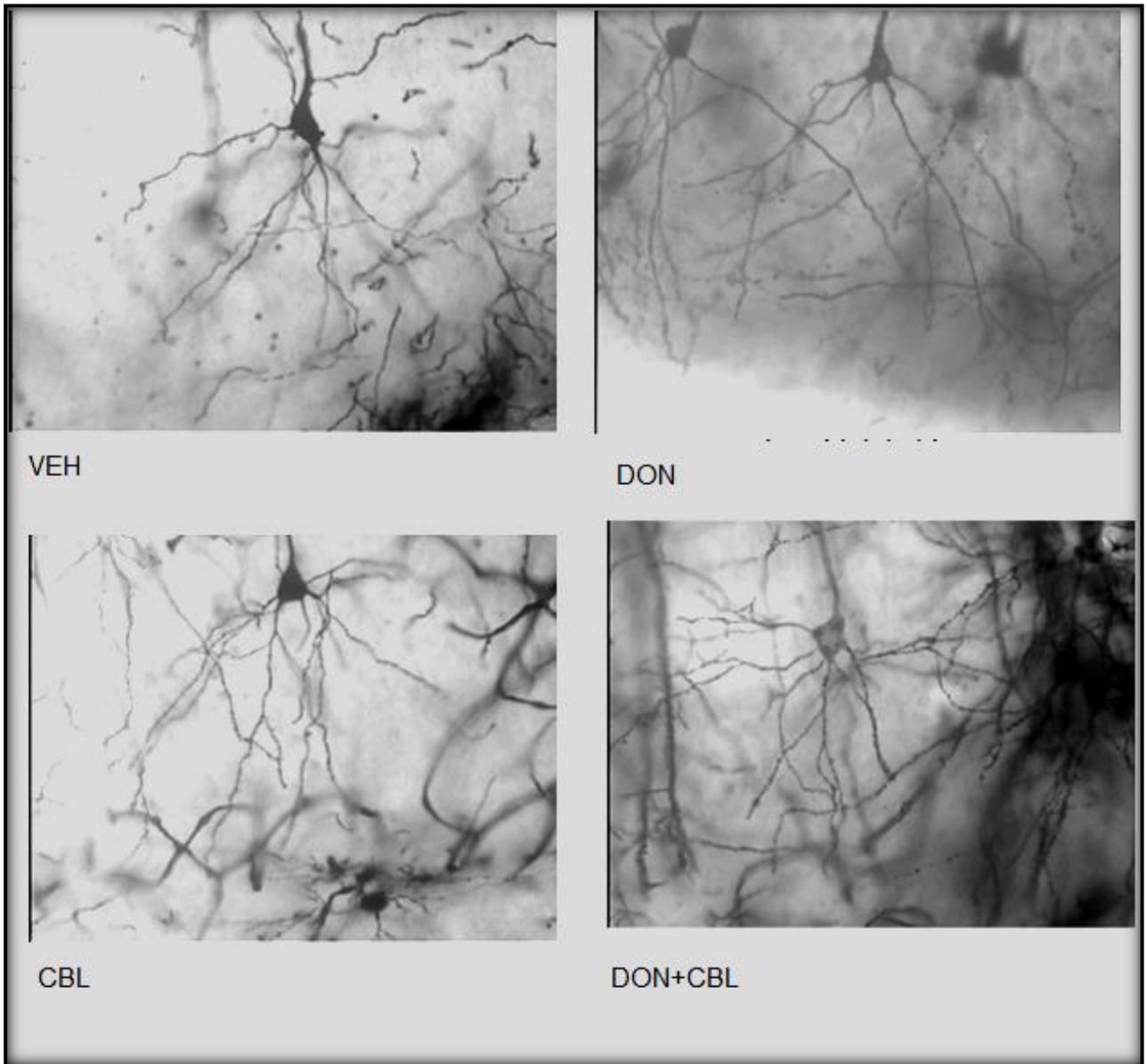
F7. Neuronas piramidales del hipocampo dorsal región CA1 (20µm)



F8. Espinas distales en dendritas basales de neuronas piramidales en HDCA1 (5µm)



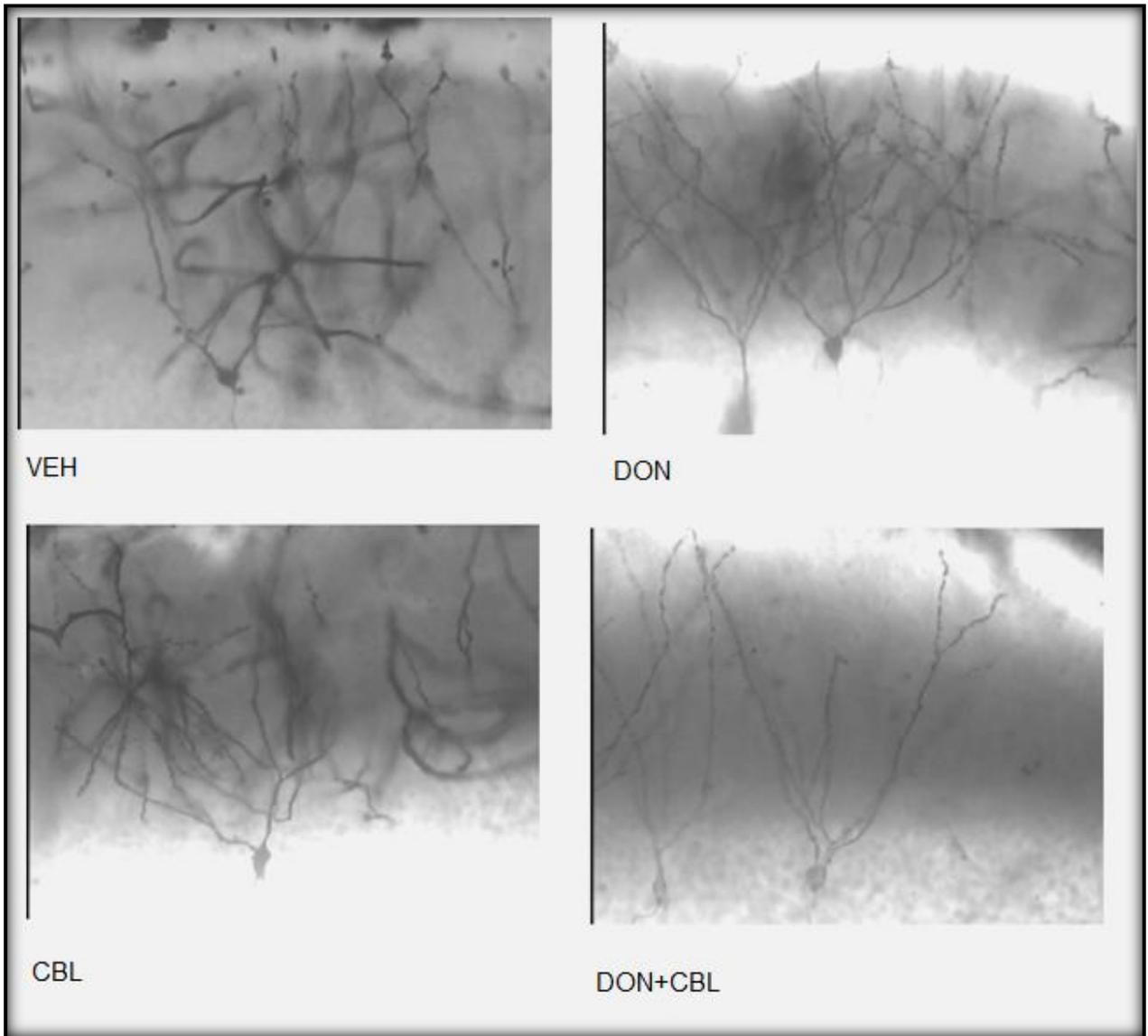
F9. Neuronas piramidales del hipocampo ventral región CA1 (20µm)



F10. Espinas distales de neuronas piramidales en HVCA1 (5µm)



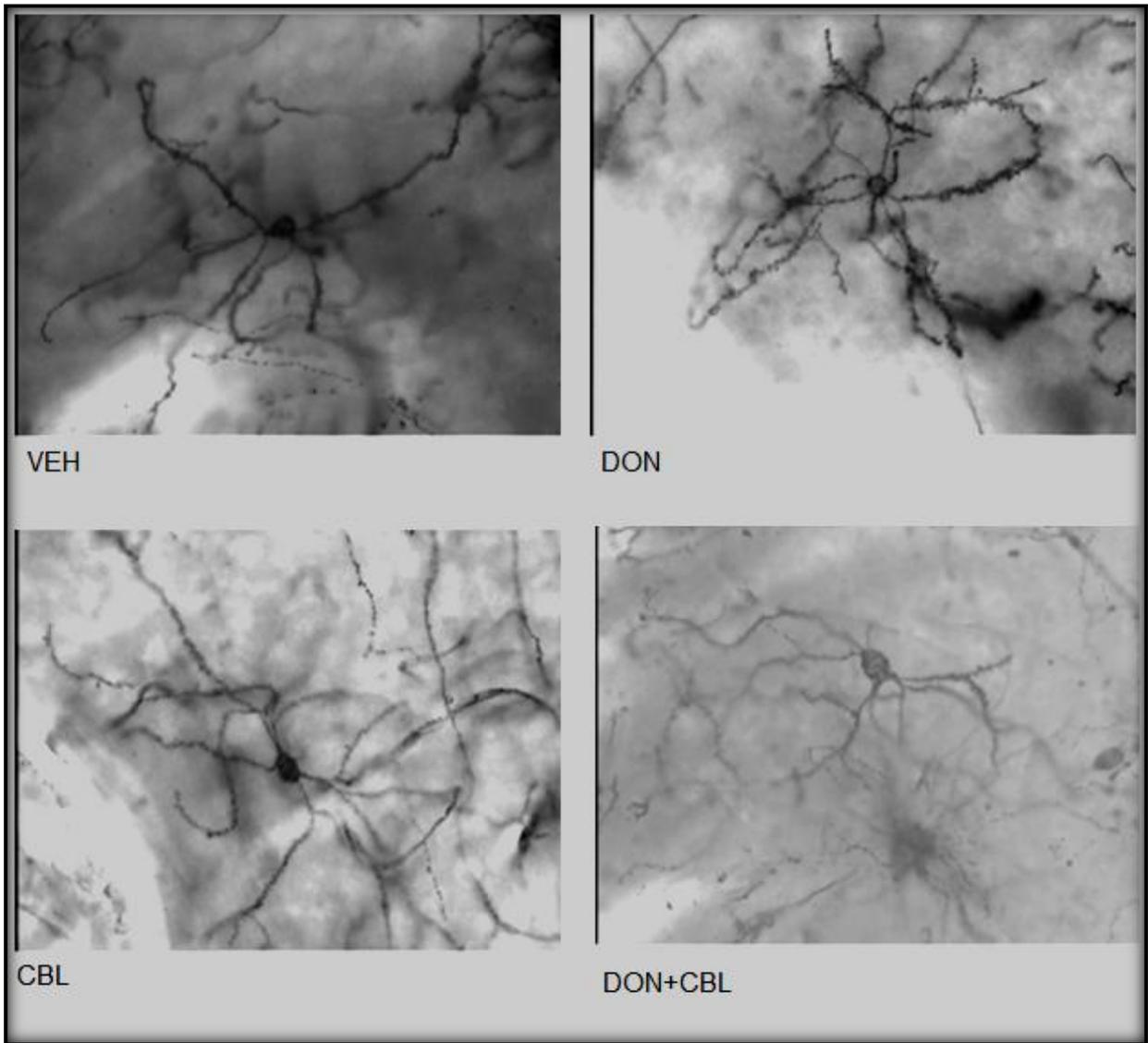
F11. Neuronas granulosas del giro dentado en hipocampo (20µm).



F12. Espinas distales en neuronas granulosas de GD (5µm)



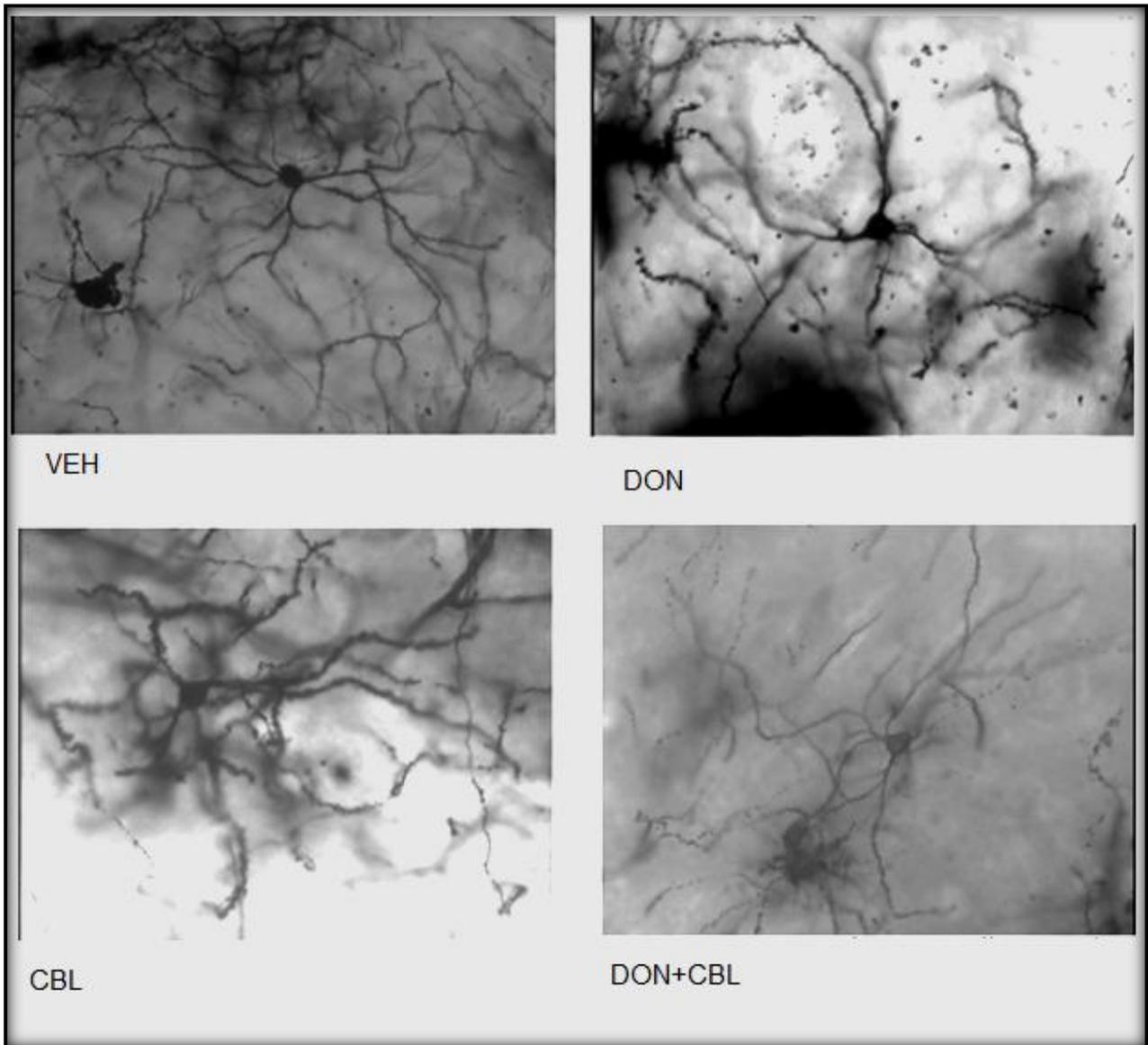
F13. Neuronas espinosas medianas en el centro del núcleo accumbens (20µm)



F14. Espinas distales de neuronas espinosas medianas en el centro del NAcc (5µm)



F15. Neuronas espinosas medianas en la coraza del núcleo accumbens (20µm)



F16. Espinas distales de neuronas espinosas medianas en la coraza del NAcc (5µm)



