



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(MODALIDAD TRADICIONAL)

TESIS

**EFFECTO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA EN LA MEMORIA
ESPACIAL DE RATAS ENVEJECIDAS**

PRESENTA

M. en C. MAYRA MACEDO MENDOZA

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

DR. JOSÉ LUIS QUINTANAR STEPHANO

DRA. MARINA LILIANA GONZÁLEZ TORRES

DRA. MARÍA CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA

AGUASCALIENTES, AGS; JUNIO DEL 2025

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MAYRA MACEDO MENDOZA** con ID 115941 quien realizó la tesis titulada: **EFFECTO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA EN LA MEMORIA ESPACIAL DE RATAS ENVEJECIDAS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 05 de junio del año 2025.



Dr. José Luis Quintanar Stephano
Tutor de tesis



Dra. Marina Lilitana González Torres
Co-Tutor de tesis



Dra. María Consolación Martínez Saldaña
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 10 de junio de 2025

NOMBRE: Mayra Macedo Mendoza ID: 115941

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional LGAC (del posgrado): Estudio de Proteínas en Sistemas Biológicos

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Efecto del acetato de leuprolida en la memoria espacial de las ratas envejecidas

Actualmente, más del 10% de la población mundial tiene 65 años o más, y esta cifra sigue en aumento. El envejecimiento demográfico, caracterizado por el aumento en la proporción de adultos mayores debido a la baja natalidad y al incremento en la esperanza de vida, es un fenómeno global que también afecta a México. Este cambio demográfico representa un reto importante para los sistemas de salud pública, especialmente por la creciente prevalencia de enfermedades neurodegenerativas y deterioro cognitivo asociado a la edad. Se estima que cerca del 40% de las personas mayores de 65 años experimentan algún grado de pérdida de memoria, mientras que el deterioro cognitivo leve (DCL) afecta aproximadamente al 16% de los mayores de 70 años y la demencia al 14%. Además, entre el 15% y el 20% de quienes presentan DCL podrían desarrollar demencia posteriormente. La gravedad del deterioro cognitivo está fuertemente vinculada a los ingresos hospitalarios, así como con una mayor probabilidad de sufrir efectos adversos durante la estancia en un hospital. En este contexto, la presente investigación evalúa los efectos del acetato de leuprolida sobre la memoria espacial en un modelo de envejecimiento en ratas Wistar macho, con el fin de generar evidencia científica que contribuya al desarrollo de alternativas terapéuticas para preservar la función cognitiva en la vejez. El impacto social de este trabajo radica en su potencial para atender una necesidad creciente: mejorar la calidad de vida de las personas adultas mayores mediante la prevención o mitigación del deterioro de la memoria, una función crucial para la autonomía, la integración social y el bienestar general. La generación de conocimiento sobre los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la pérdida de memoria y su posible modulación farmacológica no solo enriquece el campo de la neurociencia del envejecimiento, sino que también sienta las bases para futuras aplicaciones clínicas orientadas a un envejecimiento saludable. A largo plazo, este tipo de investigaciones puede contribuir a reducir la carga social y económica derivada de la atención a pacientes con deterioro cognitivo y demencia, fortaleciendo así la respuesta de los sistemas de salud frente a una población en proceso de envejecimiento acelerado.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
<i>SI</i>				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>SI</i>				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>SI</i>				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>SI</i>				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>SI</i>				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>SI</i>				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>SI</i>				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>NO</i>				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>SI</i>				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
<i>SI</i>				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>SI</i>				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<i>SI</i>				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>N.A.</i>				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>SI</i>				Coincide con el título y objetivo registrado
<i>SI</i>				Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>SI</i>				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<i>SI</i>				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>				
				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa.
				El estudiante es el primer autor
				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Sí No

FIRMAS

Elaboró:
 * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:
Dr. Daniel Cervantes García
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:
Dr. Gilberto Alejandro Osorio Acosta
 * En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano
 Revisó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:
Dr. Alejandro Padilla Díaz
 Autorizó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:
M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
 En cumplimiento con el Art. 105F del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: "... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

SPATIAL MEMORY RECOVERY IN AGED MALE RATS TREATED WITH LEUPROLIDE ACETATE, A GnRH AGONIST

M. Macedo-Mendoza¹, D. Calderón-Vallejo^{1,2}, M.L. González-Torres³, A. Martínez-Martínez³,
D. Gasca-Martínez⁴, E.M. Orta Salazar⁴, J.L. Quintanar^{1,*}

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Department of Physiology and Pharmacology, ²Department of Morphology, ³Universidad Autónoma de Aguascalientes, Department of Psychology, Aguascalientes, ⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Juruquilla, Querétaro, México

Abstract

Context. Studies indicate a decrease in spatial memory across species as they age. Moreover, consistent administration of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) improves learning abilities in older rats that have undergone gonadectomy.

Objective. The aim of this study was to investigate the effects of the GnRH agonist, leuprolide acetate (LA) on spatial memory in aged intact male rats and the expression of proteins associated with hippocampal plasticity.

Subjects and methods. Aged male rats were injected with LA or saline every three days for nine weeks to assess the effects of LA on spatial memory. The aged rats were trained in the Morris Water Maze for four days, and the evaluation took place on the fifth day. Additionally, the Y-maze test was used to investigate short-term spatial memory. The expression of spinophilin and microtubule-associated protein 2 (MAP2) in the hippocampus was measured.

Results. Behavioral tests revealed that LA improves spatial memory in aged rats. Additionally, we observed increased expression of spinophilin and MAP2 in the hippocampus of aged male rats following LA treatment. Based on these results, the administration of LA holds is a potential treatment for restoring cognitive function in aged individuals.

Keywords: Gonadotropin releasing-hormone agonist, Hippocampus, Spinophilin, MAP2, Morris water maze.

INTRODUCTION

Throughout adulthood, physiological functions gradually decline, and these changes

during aging increase vulnerability to diseases and mortality (1). Age-related physiological changes are primary risk factors for various pathologies, including diabetes, cancer, cardiovascular disorders, and neurodegenerative diseases (2,3). Memory loss is a prominent manifestation of normal cognitive aging (4). The hippocampus, a critical structure for spatial learning and memory, is particularly susceptible to the aging process and essential for normal learning and memory consolidation (5). Adult neurogenesis takes place in the dentate gyrus (DG), a critical structure within the hippocampus that plays a pivotal role in processing spatial memory (6). Anatomical and electrophysiological studies have shown that the hippocampus of aged rats experiences synaptic loss in the DG, dysregulation of Ca²⁺ in the CA1 region, and a decrease in NMDA receptor density on DG granule cells (7). Moreover, the hippocampus exhibits neurogenic plasticity influenced by environmental challenges, where spatial learning affects the proliferation, survival, maturation, and activation of newborn neurons (8). The hippocampus also contains a dense concentration of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors, and GnRH administration has been shown to impact dendritic spine density (9,10). Recently, it was demonstrated that chronic GnRH administration improves learning in aged gonadectomized rats (11). Leuprolide Acetate (LA), a synthetic GnRH agonist analog, exhibits greater binding affinity to GnRH receptors and increased biological activity compared to the natural hormone and is less susceptible to proteolysis (12). LA and other agonists are used as a

*Correspondence to: J. Luis Quintanar. Depto. de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940 C.P. 20100, Col. Ciudad Universitaria, Aguascalientes Ags., México, E-mail: jose.quintanar@edu.uaa.mx

Acta Endocrinologica (Buc), vol. XX, no. 2, p. 127-135, 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por ser mi casa de estudios desde el bachillerato hasta ahora, sin lugar a dudas el crecimiento personal y profesional que me ha brindado ha sido enorme. Así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) del cual tuve el beneficio de ser becario en mis estudios de Doctorado.

Agradezco especialmente al Dr. José Luis Quintanar, quién me apoyó en cada una de las etapas de este doctorado; desde el planteamiento del proyecto de investigación hasta la publicación que me permite poder hacer la entrega final de este trabajo. Particularmente agradezco su paciencia y comprensión ante las dificultades que han surgido en mi camino para llegar a este momento.

Así mismo, quiero agradecer a los demás miembros de mi comité tutor; a la Dra. María Consolación Martínez Saldaña por hacerme un espacio en su laboratorio para obtener parte de mis resultados y por todos los conocimientos en el campo de la histología que son bastos; y a la Dra. Marina Liliana González Torres por su indudable apoyo en la corrección de este documento, así como su orientación en los temas conductuales que se abordaron.

Agradezco también enormemente el apoyo que recibí por parte de la Unidad de Análisis Conductual del Instituto de Neurobiología de la UNAM, dirigido por la Dra. Daisy Gasca, quién me abrió sus puertas en momentos críticos de la pandemia para poder realizar las pruebas conductuales que se incluyeron este estudio y que me permitió alojar a mis animales en la unidad durante el mes de estancia que pasé en la ciudad de Querétaro. Así como a la Dra. Erika Orta Salazar, quién fue de mucha ayuda en esos días interminables de hacer pruebas en el laberinto acuático de Morris.

Agradezco también, el apoyo técnico que recibí por parte de Sonia Sofía Muñoz Cruz para el procesamiento histológico de mis muestras. A la Dra. Eva María Salinas Miralles y la Dra. Laura Elena Dávalos por permitirme hacer uso su equipo para la obtención de los resultados moleculares; así como a la Dra. Karina Alejandra Pedroza por todo el apoyo y orientación para la realización de los Western blot. Finalmente, a la Dra. Denisse Calderón Vallejo por sus correcciones y aportes al manuscrito derivado de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi hijo, Leonel que llegó en el camino de este trabajo y transformó mi mundo. Terminar esta tesis ha sido, muchas veces, una lucha entre tiempos: entre lo que debía entregar y lo que quería abrazar. Porque cuando estaba contigo, el trabajo esperaba. Elegirte fue lo mejor que he hecho, incluso si eso significó detenerme, ajustar el rumbo y volver a empezar. Esta tesis es también tuya, porque persistí por ti y para ti. Ojalá un día leas esto y sepas que, aún sin entenderlo, me diste la fuerza para no rendirme.

A mi esposo, por acompañarme incluso en los días donde yo misma dudaba si podía. Por sostenerme e impulsarme. Gracias por tu paciencia, tus palabras de ánimo y por quedarte conmigo cuando el camino se sentía complicado.

A mi abuelo, quien me acompañó con orgullo en cada paso de mi formación y a quien le quedé debiendo este título. Siempre preguntabas si ya lo había terminado, y aunque no alcancé a mostrártelo, sé que me sigues acompañando. Esta tesis también es para ti, con el amor y gratitud infinita de tu nieta.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS 4

ÍNDICE DE FIGURAS 5

LISTA DE ABREVIATURAS 7

RESUMEN 9

ABSTRACT 10

1. INTRODUCCIÓN 11

2. MARCO TEÓRICO 12

2.1 ENVEJECIMIENTO 12

2.1.1 DATOS DEMOGRÁFICOS 13

2.1.2 MECANISMOS MOLECULARES 17

2.1.3 DETERIORO COGNITIVO 20

2.1.4 INTERVENCIONES PARA DETENER EL DETERIORO COGNITIVO .. 22

2.1.5 ENVEJECIMIENTO CEREBRAL 23

2.2 HIPOCAMPO 25

2.3 APRENDIZAJE Y MEMORIA 28

2.3.1 MEMORIA ESPACIAL 32

2.4 PLASTICIDAD NEURONAL 35

2.4.1 ESPINAS DENDRÍTICAS 37

2.4.2 ESPINOFILINA 40

2.4.3 MAP2 41

2.5 HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINA HIPOTALÁMICA (GnRH) 43

2.5.1 EFECTOS DE LA GnRH EN MEMORIA Y APRENDIZAJE 47

2.6 ANÁLOGOS DE LA GnRH 48

2.6.1 ACETATO DE LEUPROLIDA 48

3. JUSTIFICACIÓN 51

4. HIPÓTESIS 51

5. OBJETIVOS 52

5.1 OBJETIVO GENERAL 52

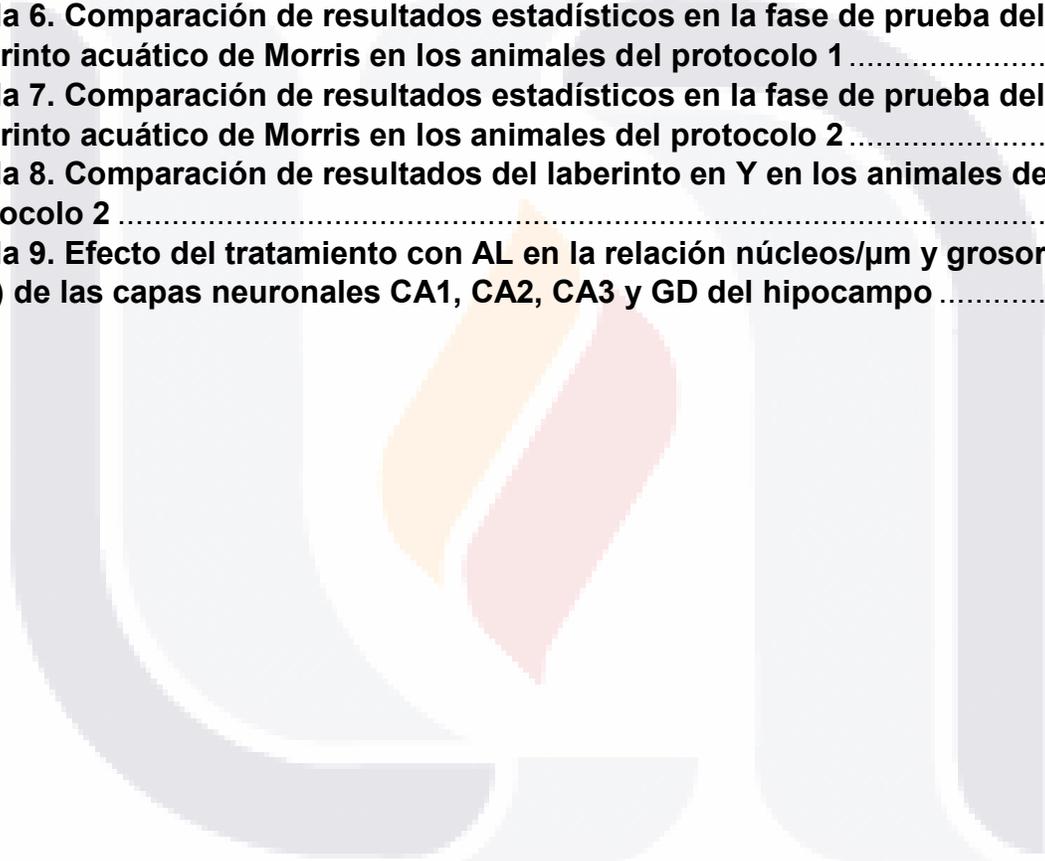
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES 52

6. MÉTODOS	53
6.1 ANIMALES EXPERIMENTALES	53
6.2 TRATAMIENTO	53
6.3 PRUEBAS CONDUCTUALES	54
6.3.1 PRUEBA DE LOCOMOCIÓN: CAMPO ABIERTO	55
6.3.2 PRUEBA DE MEMORIA ESPACIAL: LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS	57
6.3.3 PRUEBA DE MEMORIA ESPACIAL: LABERINTO EN Y	59
6.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	61
6.4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	61
6.4.2 ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS	63
6.4.3 INMUNODETECCIÓN	63
6.5 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	64
6.5.1 EVALUACIÓN DE LA DENSIDAD NEURONAL	65
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
7. RESULTADOS	67
7.1 CAMPO ABIERTO: EL ENVEJECIMIENTO Y EL TRATAMIENTO CON ACETATO DE LEUPROLIDA EN RATAS WISTAR MACHO NO AFECTAN LA LOCOMOCIÓN	67
7.2 PROTOCOLO 1: TRATAMIENTO POR 5 SEMANAS	70
7.2.1 CURVA DE APRENDIZAJE DURANTE LA FASE DE ENTRENAMIENTO DEL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS	70
7.2.2 EL ACETATO DE LEUPROLIDA DISMINUYE EL TIEMPO DE LATENCIA EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS TRAS 5 SEMANAS DE TRATAMIENTO	71
7.2.3 EL ACETATO DE LEUPROLIDA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ESPINOFILINA EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ENVEJECIDAS TRAS 5 SEMANAS DE TRATAMIENTO SIN AFECTAR MAP2 O NF-200	73
7.3 PROTOCOLO 2: TRATAMIENTO POR 9 SEMANAS	75
7.3.1 CURVA DE APRENDIZAJE DURANTE LA FASE DE ENTRENAMIENTO DEL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS	75
7.3.2 EL ACETATO DE LEUPROLIDA MEJORA EL RENDIMIENTO EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS TRAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO	76
7.3.3 LABERINTO EN Y: EL TRATAMIENTO CON ACETATO DE LEUPROLIDA POR 9 SEMANAS MEJORA LA MEMORIA ESPACIAL A CORTO PLAZO	78

7.3.4 EL ACETATO DE LEUPROLIDA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ESPINOFILINA Y MAP2 EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ENVEJECIDAS TRAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO SIN AFECTAR NF-200	80
7.3.5 EL TRATAMIENTO CON ACETATO DE LEUPROLIDA DURANTE 9 SEMANAS ATENÚA LAS ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE NÚCLEOS Y EL GROSOR DE LAS CAPAS NEURONALES DEL HIPOCAMPO DADAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN CA3 Y GD	82
7.3.6 OBSERVACIONES COMPLEMENTARIAS DURANTE EL TRATAMIENTO POR 9 SEMANAS	84
7.3.6.1 SEGUIMIENTO DEL PESO CORPORAL	84
7.3.6.2 PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA	86
7.3.6.3 HALLAZGOS INCIDENTALES: MASA TUMORAL A LA SEMANA 6 Y LESIÓN CUTÁNEA A LA SEMANA 8	86
8. DISCUSIÓN	89
9. CONCLUSIONES	97
10. REFERENCIAS	99
11. ANEXOS	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. La disminución de la memoria espacial es común durante el envejecimiento de los mamíferos	35
Tabla 2. Análogos de la GnRH (De acuerdo a Conn y Crowley, 1994)	48
Tabla 3. Posiciones de salida de las ratas en la fase de entrenamiento del laberinto acuático de Morris	58
Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el análisis de proteínas mediante la técnica de Western blot.....	63
Tabla 5. Comparación de resultados en la prueba de campo abierto en los animales del protocolo 1 y 2	69
Tabla 6. Comparación de resultados estadísticos en la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en los animales del protocolo 1	72
Tabla 7. Comparación de resultados estadísticos en la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en los animales del protocolo 2	78
Tabla 8. Comparación de resultados del laberinto en Y en los animales del protocolo 2	79
Tabla 9. Efecto del tratamiento con AL en la relación núcleos/μm y grosor (μm) de las capas neuronales CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo	84



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Signos distintivos del envejecimiento 13

Fig. 2. Población mundial con 65 años de edad y más (% del total) 14

Fig. 3. Población con 60 años y más en el territorio mexicano 15

Fig. 4. Comparativa entre los índices de envejecimiento y el número de nacimientos registrados en México..... 16

Fig. 5. Anatomía de la formación hipocampal..... 26

Fig. 6. Taxonomía de los sistemas de memoria en mamíferos 31

Fig. 7. Variabilidad morfológica de las espinas dendríticas 38

Fig. 8. Representación esquemática de los dominios que integran la estructura de la espinofilina 40

Fig. 9. Representación esquemática de los dominios que integran la estructura de las isoformas de MAP2..... 42

Fig. 10. Eje hipotálamo-pituitario-gonadal 44

Fig. 11. Activación del Receptor de GnRH 46

Fig. 12. Estructura química del acetato de leuprolida 49

Fig. 13. Esquema general de trabajo para el protocolo 1 54

Fig. 14. Esquema general de trabajo para el protocolo 2..... 55

Fig. 15. Cámara utilizada para realizar la prueba de campo abierto..... 56

Fig. 16. Diseño del laberinto acuático de Morris..... 57

Fig. 17. Evaluación de la memoria espacial con el laberinto acuático de Morris..... 59

Fig. 18. Vista del laberinto en Y..... 60

Fig. 19. Evaluación de alternancia espontánea en el laberinto en Y 61

Fig. 20. Ejemplo de curva BSA para cuantificación de proteínas..... 62

Fig. 21. Coordenadas de los cortes coronales del cerebro 64

Fig. 22. Representación esquemática del análisis histológico..... 65

Fig. 23. Comparación de la distancia total recorrida (cm) en la prueba de campo abierto 67

Fig. 24. Comparación del tiempo de actividad (s) en la prueba de campo abierto..... 68

Fig. 25. Comparación del tiempo en reposo (s) durante la prueba de campo abierto..... 69

Fig. 26. Resultados del laberinto acuático de Morris durante la fase de adquisición o entrenamiento del protocolo 1 71

Fig. 27. Resultados de la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en el protocolo 1 72

Fig. 28. Expresión de espinofilina en el hipocampo de los animales del protocolo 1 73

Fig. 29. Expresión de MAP2 en el hipocampo de los animales del protocolo 1 74

Fig. 30. Expresión de NF-200 en el hipocampo de los animales del protocolo 1..... 74

Fig. 31. Resultados del laberinto acuático de Morris durante la fase de adquisición o entrenamiento del protocolo 2 76

Fig. 32. Resultados de la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en el protocolo 2 77

Fig. 33. Resultados de la prueba de laberinto en Y tras 9 semanas de tratamiento. 79

Fig. 34. Expresión de espinofilina en el hipocampo de los animales del protocolo 2. 80

Fig. 35. Expresión de MAP2 en el hipocampo de los animales del protocolo 2 81

Fig. 36. Expresión de NF-200 en el hipocampo de los animales del protocolo 2..... 81

Fig. 37. Resultados histológicos en el hipocampo de los animales del protocolo 2 83

Fig. 38. Seguimiento del peso corporal de los grupos envejecidos durante las 9 semanas de tratamiento 85

Fig. 39. Porcentaje de supervivencia en los grupos envejecidos tratados por 9 semanas 86

Fig. 40. Hallazgo tumoral incidental en rata envejecida tratada con AL por 6 semanas 87

Fig. 41. Hallazgo de lesión cutánea incidental en rata envejecida tratada con AL por 8 semanas 88

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

ABP: Proteínas de unión a la actina

ACh: Acetilcolina

ACV: Accidente cerebrovascular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AL: Acetato de leuprolida

AMPA: Receptor de glutamato de tipo AMPA

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARP3: Proteína 3 relacionada con la actina

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CA1: Cuerno de Amón 1

CA2: Cuerno de Amón 2

CA3: Cuerno de Amón 3

Ca²⁺: Calcio

CE: Corteza entorrinal

CEL: Corteza entorrinal lateral

CEM: Corteza entorrinal medial

DAG: Diacilglicerol

DCL: Deterioro cognitivo leve

DHA: Ácido docosahexaenoico

EA: Enfermedad de Alzheimer

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FSH: Hormona folículoestimulante

GD: Giro dentado

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GnRHR: Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

H/E: Hematoxilina y eosina

HPG: Eje hipotalámico-pituitario-gonadal

INEGI: Instituto nacional de estadística y geografía

IP3: Inositol trifosfato

LH: Hormona luteinizante

LTD: Depresión a largo plazo

LTM: Lóbulo temporal medial

LTP: Potenciación a largo plazo

MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2

miRNA: Micro ácido ribonucleico

NCD: Trastorno neurocognitivo leve

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC: Proteína quinasa C

PLA2: Fosfolipasa A2

PP1: Proteína fosfatasa 1

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SASP: Fenotipo secretor asociado a la senescencia

SGZ: Zona subgranular

SNC: Sistema nervioso central

SS: Solución salina

SVZ: Zona subventricular

TENS: Estimulación nerviosa eléctrica transcutánea

UV: Ultravioleta

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

En el cerebro, el proceso de envejecimiento puede implicar una pérdida de neuronas en áreas específicas como el hipocampo, que es una estructura clave para la memoria y el aprendizaje espacial. Como consecuencia, el hipocampo tiende a reducirse en tamaño y experimenta una pérdida sináptica, siendo el deterioro de la memoria una manifestación prominente del envejecimiento cognitivo normal. El hipocampo contiene una alta concentración de receptores de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y se ha demostrado que la administración de GnRH impacta positivamente en su densidad de espinas dendríticas. El objetivo del presente estudio fue investigar los efectos del acetato de leuprolida (AL), un análogo sintético de la GnRH, sobre la memoria espacial y la plasticidad del hipocampo en ratas macho envejecidas. Para ello, se realizaron diferentes pruebas conductuales como la prueba de campo abierto, el laberinto acuático de Morris y el laberinto en Y. Además, se evaluaron los niveles de expresión de proteínas asociadas con la neuroplasticidad en el hipocampo, como la espinofilina, la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y la proteína de neurofilamentos de alto peso molecular (NF-200). También se realizaron análisis histológicos con tinción de hematoxilina y eosina (H/E), con los que se midió el grosor y la densidad nuclear (núcleos/ μm) en la capa de células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, así como en la capa granular del giro dentado (GD). El número de núcleos observados se utilizó como un indicador indirecto de la densidad neuronal en estas regiones. Los resultados mostraron que las ratas envejecidas tratadas con solución salina (SS) presentaron un deterioro significativo en la memoria espacial en comparación con ratas jóvenes, junto con una menor expresión de espinofilina y MAP2, y una disminución en el grosor y número de núcleos en las capas neuronales de CA3 y GD. Sin embargo, el tratamiento con AL atenuó estos efectos del envejecimiento, mejorando el rendimiento en las pruebas de memoria espacial e incrementando la expresión de dichas proteínas. En CA3 y GD, también se observó una mayor preservación del grosor y la densidad nuclear en el grupo tratado con AL en comparación con los animales envejecidos sin tratamiento, lo cual sugiere una posible reducción de la pérdida celular asociada al envejecimiento. En cuanto a la expresión de NF-200, ambos grupos envejecidos mostraron niveles más elevados que el grupo joven, sin que el tratamiento con AL modificara este efecto relacionado con la edad. En conjunto, estos hallazgos indican que la administración de AL mejora la memoria espacial en ratas macho envejecidas e induce cambios favorables en la plasticidad del hipocampo. Así, se propone que la administración de AL podría representar una estrategia terapéutica prometedora para restaurar la función cognitiva en individuos mayores.

ABSTRACT

In the brain, the aging process can involve the loss of neurons in specific regions such as the hippocampus, a key structure for memory and spatial learning. As a result, the hippocampus tends to shrink in size and undergo synaptic loss, with memory decline being a prominent manifestation of normal cognitive aging. The hippocampus contains a high concentration of receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH), and it has been shown that GnRH administration positively influences dendritic spine density in this region. The aim of the present study was to investigate the effects of leuprolide acetate (LA), a synthetic analogue of GnRH, on spatial memory and hippocampal plasticity in aged male rats. To this end, various behavioral tests were conducted, including the open field test, the Morris water maze, and the Y-maze. Additionally, the expression levels of neuroplasticity-related proteins in the hippocampus were evaluated, such as spinophilin, microtubule-associated protein 2 (MAP2), and high-molecular-weight neurofilament protein (NF-200). Histological analyses were also performed using hematoxylin and eosin (H/E) staining to measure the thickness and nuclear density (nuclei/ μm) in the pyramidal cell layer of the CA1, CA2, and CA3 regions of the hippocampus, as well as in the granule cell layer of the dentate gyrus (DG). The number of observed nuclei was used as an indirect indicator of neuronal density in these regions. The results showed that aged rats treated with saline solution (SS) exhibited significantly impaired spatial memory compared to young rats, along with reduced expression of spinophilin and MAP2, and a decrease in both the thickness and number of nuclei in the neuronal layers of CA3 and DG. However, treatment with LA attenuated these aging-related effects by improving performance in spatial memory tasks and increasing the expression of these proteins. In CA3 and DG, a greater preservation of thickness and nuclear density was also observed in the LA-treated group compared to untreated aged animals, suggesting a possible reduction in age-related cell loss. Regarding NF-200 expression, both aged groups showed higher levels than the young group, with LA treatment having no significant effect on this age-related increase. Altogether, these findings indicate that LA administration improves spatial memory in aged male rats and induces favorable changes in hippocampal plasticity. Thus, LA treatment may represent a promising therapeutic strategy to restore cognitive function in the elderly.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la vejez, las funciones fisiológicas disminuyen gradualmente, lo que constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de diversas patologías, como la diabetes, el cáncer, los trastornos cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas, las cuales, a su vez, aumentan la mortalidad de los individuos (Fulop et al., 2010). En el cerebro, el proceso de envejecimiento puede implicar la pérdida de neuronas, lo que conlleva una reducción en la plasticidad cerebral (Fu et al., 2015). Así, algunas áreas específicas del cerebro, como el hipocampo, que es clave para la memoria y el aprendizaje espacial, tienden a reducirse en tamaño; siendo la pérdida de memoria una manifestación prominente del envejecimiento cognitivo normal (Driscoll et al., 2003).

Estudios anatómicos y electrofisiológicos han demostrado que los hipocampos de ratas envejecidas experimentan una pérdida sináptica en el giro dentado (GD), así como desregulación de Ca^{+2} en la región CA1 y una disminución en la respuesta mediada por el receptor NMDA en las células granulares del GD, lo cual produce alteraciones en la potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD) que perjudica la codificación de recuerdos en mamíferos (Rosenzweig & Barnes, 2003). El hipocampo también contiene una alta concentración de receptores de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y, se ha demostrado mediante estudios en cultivo que su administración a dosis bajas impacta positivamente en la densidad de espinas dendríticas hipocámpales (Prange-Kiel et al., 2008). Así mismo, previamente se ha estudiado que la administración crónica de GnRH mejora el aprendizaje en ratas envejecidas gonadectomizadas (González-Torres et al., 2019).

El acetato de leuprolida (AL), un análogo sintético de la GnRH, exhibe una mayor afinidad de unión a los receptores de GnRH y, por lo tanto, una mayor actividad biológica en comparación con la hormona natural; además que es menos susceptible a la proteólisis (Periti et al., 2002). Si bien, el AL y otros agonistas de la GnRH se utilizan como tratamiento para diversos trastornos endocrinos que responden a la disminución de los esteroides gonadales; algunos trabajos han demostrado su posible papel en la regeneración neuronal, siendo efectivo en la recuperación de lesiones de la médula espinal (Díaz Galindo et al., 2015; Palacios et al., 2022) lesiones del nervio ciático (Hernández-Jasso et al., 2020) y glaucoma (Esparza-Leal et al., 2022). Adicionalmente, este fármaco se ha propuesto como un tratamiento potencial para contribuir a la estabilización del deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer (EA) (LaPlante et al., 2006). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el AL podría ejercer un efecto benéfico sobre la memoria en animales envejecidos, similar a lo demostrado previamente con la GnRH, lo cual constituye el objeto de investigación en esta tesis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un fenómeno natural y multifactorial que se caracteriza por un deterioro fisiológico, donde existe una reducción gradual de la efectividad de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, así como de sus órganos y tejidos, lo que aumenta el riesgo de diversas patologías y la muerte (Isaev et al., 2019). Viña et al., definen el envejecimiento a partir de cuatro postulados propuestos por Strehler: es universal, es intrínseco, es progresivo y es deletéreo. Es decir, es un fenómeno que puede ocurrir en todos los individuos, que depende de causas endógenas, que ocurre de forma gradual a lo largo de la vida y que repercute sobre el bienestar del individuo (Viña et al., 2007).

Actualmente, existen diferentes teorías que buscan dar una explicación a las causas del envejecimiento, sin embargo, todas ellas pueden dividirse en dos grupos principales: 1) las que postulan que el envejecimiento es un proceso genéticamente programado y 2) las que señalan que el envejecimiento es un proceso aleatorio causado por un daño gradual del organismo a lo largo del tiempo, como resultado de sus actividades vitales (Isaev et al., 2019). Aunque hasta el momento no se han determinado claramente las causas del envejecimiento, hay al menos cinco características comunes notables en los mamíferos: un aumento de la mortalidad después de la maduración, cambios en la composición bioquímica de los tejidos, una disminución progresiva de la capacidad fisiológica, una capacidad reducida para responder de forma adaptativa a los estímulos ambientales, y una mayor susceptibilidad y vulnerabilidad a las enfermedades (Troen, 2003).

En la actualidad, la investigación sobre la biología del envejecimiento se ha centrado en dilucidar las vías bioquímicas y genéticas que participan en su desarrollo. Gracias a ello, se han identificado algunos mecanismos implicados (**Fig. 1**), como la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, disfunción mitocondrial, una comunicación intercelular alterada, detección de nutrientes desregulada, agotamiento de células madre y la senescencia celular (Li et al., 2021). Si bien el envejecimiento no es en sí mismo una enfermedad, ya que muchos adultos mayores mantienen una buena salud física y mental hasta bien entrada la vejez; se ha reconocido como el principal factor de riesgo para el desarrollo de muchas enfermedades graves y crónicas, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas, como la EA; por lo que una mejor comprensión de los factores

que contribuyen a controlar los procesos de envejecimiento es esencial para promover un envejecimiento saludable (Tenchov et al., 2024).

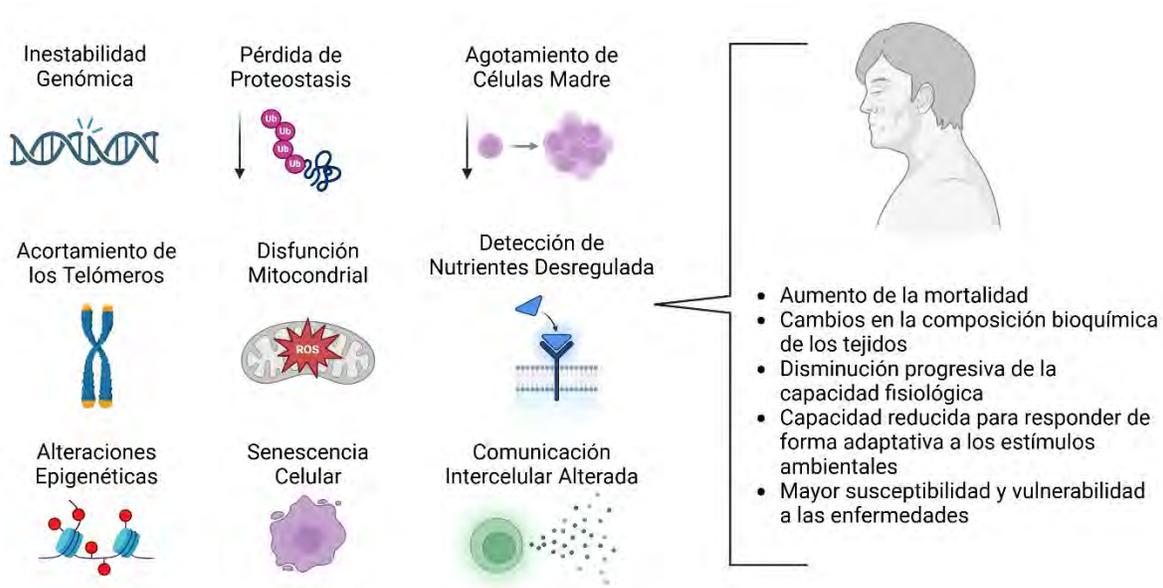


Fig. 1. Signos distintivos del envejecimiento (Creado en BioRender.com). De acuerdo a Li et al., 2021 en mamíferos, se reconocen nueve mecanismos implicados en el envejecimiento: inestabilidad genómica, pérdida de proteostasis, agotamiento de células madre, acortamiento de los telómeros, disfunción mitocondrial, detección de nutrientes desregulada, alteraciones epigenéticas, senescencia celular y comunicación intercelular alterada.

2.1.1 DATOS DEMOGRÁFICOS

El Banco Mundial ha registrado a través del tiempo un aumento gradual en el porcentaje de personas mayores a 65 años (**Fig. 2**). Su última estimación señala un total aproximado de 805 millones de personas mayores a 65 años, que representan un 10% del total de la población mundial, según datos obtenidos hasta el 2023 (Banco Mundial, 2024). Estos aumentos en la esperanza de vida se relacionan directamente con el progreso médico y económico, y se proyecta que las cifras sigan incrementándose en los próximos años. Sin embargo, muchas naciones a su vez han experimentado cambios en las tasas de natalidad, las cuales han ido decreciendo, lo que plantea problemáticas asociadas con el sustento de las generaciones futuras de adultos mayores (Foro Mundial, 2014).

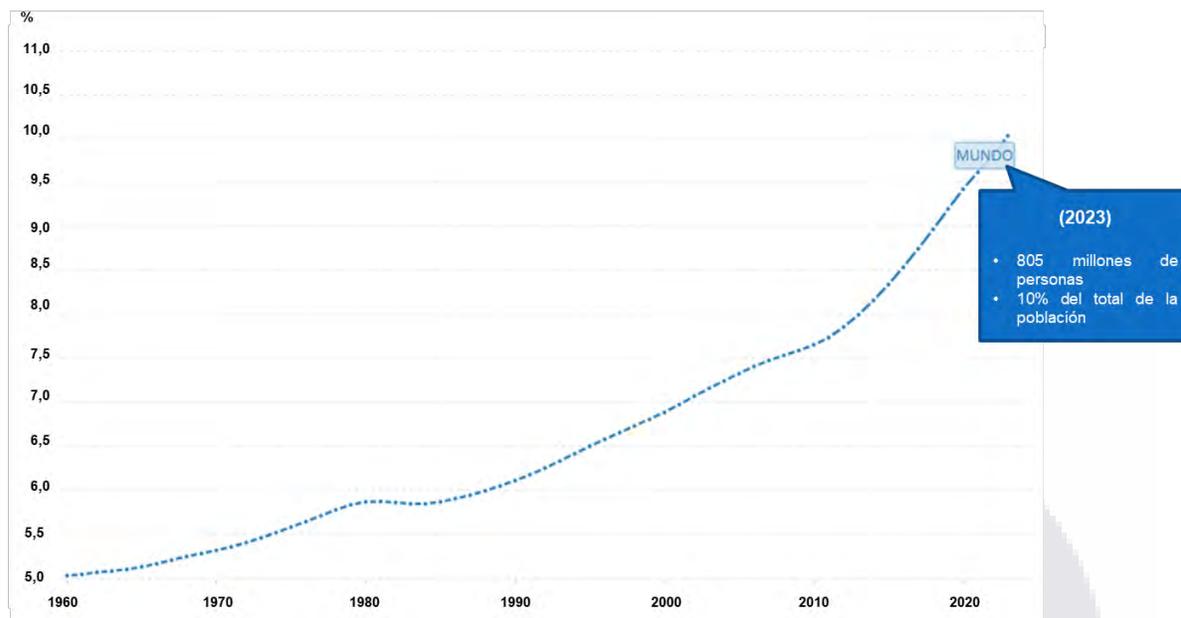


Fig. 2. Población mundial con 65 años de edad y más (% del total) (Adaptado de Banco Mundial, 2024). Se muestra un aumento gradual en el porcentaje de personas adultas mayores a nivel mundial a través del tiempo. Desde 1960 donde este porcentaje representaba un 4.97%, hasta 2023 donde la población envejecida representa el 10% del total de la población mundial.

El envejecimiento demográfico es un fenómeno que se define como el incremento en la proporción de personas adultas mayores dentro de una población, generalmente debido a una disminución en las tasas de natalidad y un aumento en la esperanza de vida (Légaré, 2015). Este proceso se ha manifestado en la mayoría de las naciones a nivel global, y México no constituye una excepción. Diversos estudios han evidenciado que la distribución geográfica de la población adulta mayor en el territorio nacional no es homogénea. En particular, se ha identificado una concentración considerablemente mayor en la región central del país. En este contexto, durante el año 2015, las entidades federativas con el mayor número de adultos mayores, en orden descendente, fueron: el Distrito Federal (hoy Ciudad de México), Veracruz, Oaxaca, Morelos, Yucatán, Michoacán, Sinaloa, Zacatecas, San Luis Potosí, Nayarit, Hidalgo, Guerrero, Jalisco y Durango (**Fig. 3**). Esta distribución desigual refleja patrones demográficos, económicos y sociales que requieren de un análisis detallado para comprender sus causas y efectos en el desarrollo regional (González, 2015).



Fig. 3. Población con 60 años y más en el territorio mexicano (Tomado de González, 2015). En el año 2015, las entidades federativas con el mayor número de adultos mayores, en orden descendente, fueron: el Distrito Federal (hoy Ciudad de México), Veracruz, Oaxaca, Morelos, Yucatán, Michoacán, Sinaloa, Zacatecas, San Luis Potosí, Nayarit, Hidalgo, Guerrero, Jalisco y Durango.

Asimismo, en su último censo poblacional realizado en 2020, el INEGI estimó un índice de envejecimiento de 47.7, lo que significa que hay cerca de 48 personas adultas mayores por cada 100 niños y jóvenes en México. Este dato casi duplica los índices reportados en 2005, donde el índice de envejecimiento fue de 26.4 (INEGI, 2020). Además, la tasa de nacimientos registrados ha experimentado una disminución significativa; los datos más recientes indican que, hasta 2023, se registraron 1,820,888 nacimientos, frente a los 2,478,889 nacimientos reportados 10 años atrás (INEGI, 2023) (**Fig. 4**). En conjunto, estos datos son un reflejo del envejecimiento demográfico por el que atraviesa nuestro país y destacan el acelerado cambio que está experimentando México hacia una población cada vez más envejecida.

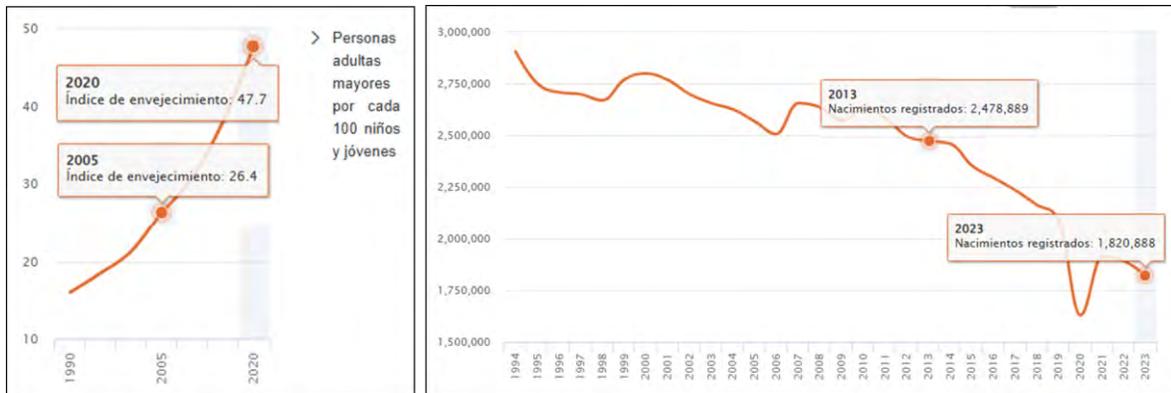


Fig. 4. Comparativa entre los índices de envejecimiento y el número de nacimientos registrados en México (Adaptado de datos reportados por el INEGI en el Censo de Población y Vivienda 2020, y la última actualización de la Estadística de Nacimientos Registrados). Se muestra cómo en los últimos años México ha experimentado un cambio hacia una población más envejecida.

Aunque la esperanza de vida se ha incrementado de manera significativa, el análisis de datos de la Carga Global de Enfermedades ha señalado que la proporción de años vividos con buena salud se ha mantenido constante (Abbafati et al., 2020). Este fenómeno puede interpretarse como una extensión del tiempo durante el cual un individuo podría enfrentar problemas de salud asociados con el envejecimiento como cáncer, artritis, enfermedades cardíacas y trastornos neurodegenerativos. Dentro de estos padecimientos, el deterioro cognitivo y la demencia se perfilan como algunos de los más importantes. En países desarrollados, como Estados Unidos, mientras que otras enfermedades relacionadas con la edad, como el accidente cerebrovascular (ACV) y la enfermedad cardíaca isquémica, han mostrado una disminución gracias a intervenciones terapéuticas y cambios en el estilo de vida, la carga de enfermedades neurodegenerativas ha aumentado de manera drástica (Montine et al., 2021).

Se estima que alrededor del 40% de las personas de 65 años o más sufren alguna forma de pérdida de memoria. Así mismo, varios estudios han demostrado que el deterioro cognitivo leve (DCL) afecta aproximadamente al 16% de las personas mayores de 70 años, mientras que alrededor del 14% de las personas del mismo grupo de edad experimentan demencia. Además, se estima que alrededor del 15-20% de los pacientes con DCL pueden eventualmente desarrollar demencia (Brito et al., 2023).

La gravedad del deterioro cognitivo está fuertemente vinculada a los ingresos hospitalarios, donde los pacientes ancianos con deterioro cognitivo son más propensos a hospitalizaciones frecuentes en comparación con aquellos con una

función cognitiva intacta, así mismo, también enfrentan un mayor riesgo de sufrir resultados adversos durante su estadía en el hospital (Amini et al., 2019; Fogg et al., 2018). En consecuencia, resulta fundamental impulsar más investigaciones orientadas al envejecimiento saludable, con el fin de encontrar alternativas que permitan a las personas poder conservar un estado óptimo de salud (Scott et al., 2021).

2.1.2 MECANISMOS MOLECULARES

La acumulación de daño genético es una característica común del envejecimiento, debido a que, a lo largo de la vida, la integridad del ADN se ve continuamente amenazada tanto por agentes endógenos como exógenos. Entre los factores endógenos se encuentran principalmente la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los errores en la replicación y las reacciones hidrolíticas espontáneas. Por otro lado, los factores exógenos incluyen diversos tipos de amenazas físicas, químicas y biológicas, como los rayos UV, la exposición a virus, toxinas, entre otros (Hoeijmakers, 2009). Aunque existen sistemas de reparación genética que normalmente contrarrestan los daños a nivel molecular, se ha descrito en diferentes especies que durante la vejez estos mecanismos no son suficientes; lo cual conlleva a una acumulación en las mutaciones somáticas (Moskalev et al., 2013). De hecho, algunos trastornos asociados con envejecimiento prematuro, conocidos como síndromes progeroides, como el síndrome de Werner y el síndrome de Bloom, son resultado de una acumulación de deterioro al ADN (Burtner & Kennedy, 2010), por lo que la inestabilidad del genoma parece ser un cambio que impulsa el proceso de deterioro fisiológico asociado a la edad.

Así mismo, se ha demostrado que alteraciones en el ADN mitocondrial también podrían ser un factor adicional implicado, ya que estudios en ratones deficientes en la polimerasa γ mitocondrial han demostrado signos de envejecimiento prematuro, así como una reducción en la esperanza de vida (Vermulst et al., 2008). Cabe señalar que, en células senescentes, el número de mitocondrias aumenta debido a la acumulación de mitocondrias viejas y disfuncionales (Tenchov et al., 2024); donde el daño mitocondrial afecta la capacidad de la célula para suministrar energía, así como conlleva a una sobreproducción de ROS que produce daño oxidativo al ADN mitocondrial y celular (Martini & Passos, 2023).

Aunque el daño del ADN puede ocurrir en cualquier parte del genoma de forma aleatoria, regiones específicas en los cromosomas como los telómeros, resultan ser particularmente susceptibles a los cambios producidos con la edad (Blasco, 2005).

Los telómeros son estructuras de cromatina presentes en los extremos distales de los cromosomas que incluyen repeticiones de microsatélites conservadas TTAGGG, cuya función es proteger el extremo de un cromosoma de la degradación (de Lange, 2002), por lo que su acortamiento provoca que dicho mecanismo de protección se encuentre deteriorado. Estudios en humanos han señalado que existe una fuerte correlación entre los telómeros cortos y el riesgo de mortalidad (Boonekamp et al., 2013). Aunque la telomerasa replica a los telómeros en las células madre embrionarias, esta polimerasa no se expresa en la mayoría de las células somáticas de los mamíferos, lo que da lugar a una pérdida acumulativa de secuencias protectoras en los extremos de los cromosomas (Tenchov et al., 2024). Existe evidencia en modelos murinos de que los efectos degenerativos del envejecimiento en múltiples órganos como los testículos, bazo e intestinos; pueden ser revertidos mediante la reactivación genética de la telomerasa (Jaskelioff et al., 2011).

Así mismo, múltiples líneas de investigación sugieren que el envejecimiento está acompañado de cambios epigenéticos; es decir, alteraciones que no cambian directamente la secuencia del ADN, sino que controlan la forma en que se expresan los genes. Estos cambios incluyen modificaciones en factores de transcripción, alteraciones en la metilación del ADN y cambios en las características de las histonas (Tenchov et al., 2024). En relación con los factores transcripcionales se ha encontrado que la vejez conlleva a una producción y maduración aberrante de muchos ARNm, debido a alteraciones en los patrones de empalme (Harries et al., 2011). Así mismo, un metanálisis que incluyó perfiles de expresión génica en ratones, ratas y humanos, reveló que los cambios relacionados con la edad principalmente involucran alteraciones en la expresión de genes relacionados con la apoptosis y el ciclo celular; una sobreexpresión de genes involucrados con vías de inflamación, respuesta inmune y asociados con la degradación lisosomal; así como una subexpresión de genes mitocondriales asociados con el metabolismo energético (de Magalhães et al., 2009); lo que refleja una combinación de factores moleculares que contribuyen a los procesos degenerativos dados en edades avanzadas.

La senescencia celular es otro mecanismo implicado en el envejecimiento, caracterizado por la pérdida de productividad y capacidad de división de las células como respuesta al daño celular (Mylonas & O'Loughlen, 2022). Aunque todos los tipos celulares pueden experimentar este fenómeno, afecta principalmente a las células endoteliales, fibroblastos y células inmunes. Incluso las células posmitóticas o de proliferación lenta, como las del corazón y el cerebro, pueden ser susceptibles a la senescencia (Tenchov et al., 2024). Las células bajo este estado presentan alteraciones en su actividad metabólica y cambios significativos en su expresión genética, lo que conduce al desarrollo de un fenotipo secretor asociado a la

senescencia (SASP, por sus siglas en inglés). Este fenotipo se caracteriza por un incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y enzimas remodeladoras de la matriz extracelular. Estas moléculas en conjunto, pueden modificar el microambiente celular, perjudicar la reparación y regeneración de tejidos, y promover aún más el envejecimiento (Coppé et al., 2010). Cabe destacar que este proceso ha sido asociado con múltiples trastornos relacionados con la edad, como el cáncer, la diabetes, la osteoartritis, el ACV, la EA y otras demencias. Además, de que contribuye al deterioro de la vista, la movilidad y la capacidad cognitiva (Childs et al., 2015; Tenchov et al., 2024; Wissler Gerdes et al., 2020).

Las células también tienden a acumular proteínas mal plegadas como resultado del deterioro funcional de su mecanismo de homeostasis proteica (proteostasis), lo que provoca una menor viabilidad celular y el desarrollo de enfermedades como la EA y la enfermedad de Huntington (Taylor & Dillin, 2011). Las enfermedades neurodegenerativas comparten el atributo característico de la agregación proteica. En la EA, se observa la formación de placas seniles compuestas por péptido β -amiloide y la generación de ovillos neurofibrilares intraneuronales que contienen la proteína tau. De manera similar, en la enfermedad de Parkinson, la acumulación de α -sinucleína mal plegada constituye un aspecto patogénico clave (Bourdenx et al., 2017). Además, la agregación proteica también es una característica común en la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia lobar frontotemporal (Ransohoff, 2016).

Los principales elementos responsables de la preservación de la proteostasis incluyen a las chaperonas, el proteosoma ubiquitina y los sistemas proteolíticos de autofagia lisosómica. No obstante, diversos estudios han evidenciado que la proteostasis se ve alterada en casi todos los tejidos de los organismos envejecidos (Koga et al., 2011). En el hígado envejecido, la restauración de la autofagia mediada por chaperonas a través de manipulaciones genéticas puede mejorar la proteostasis y mejorar la función orgánica (Zhang & Cuervo, 2008).

Si bien, el envejecimiento no es un proceso homogéneo, sino que los órganos de un mismo individuo pueden sufrir alteraciones a diferentes ritmos (Tuttle et al., 2020), es reconocido que el cerebro es notablemente sensible a los efectos causados por la edad, donde los cambios en la expresión genética, el estrés oxidativo, las modificaciones epigenéticas y las alteraciones en la síntesis y recambio de proteínas, se manifiestan como cambios en la estructura y capacidad cognitiva, contribuyendo al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Azam et al., 2021).

2.1.3 DETERIORO COGNITIVO

La cognición es la operación de la mente que incluye todos los aspectos de la percepción, el pensamiento y el recuerdo, y por lo general, se mide en investigación mediante una amplia gama de pruebas neuropsicológicas (Montine et al., 2021). El deterioro de la función cognitiva es común y progresa a medida que envejecemos, por lo que puede manifestarse en distintos niveles de gravedad (Han et al., 2022).

De acuerdo con Peng et al. (2020), el deterioro cognitivo junto con la sarcopenia (disminución de la masa y fuerza muscular) son dos de las causas más frecuentes de discapacidad en el adulto mayor, lo cual genera grandes cargas médicas y socioeconómicas, al ser cada vez más el número de adultos mayores que carecen de independencia debido a estas discapacidades físicas y mentales (Peng et al., 2020). Durante el envejecimiento normal, el deterioro cognitivo puede manifestarse como un déficit en el dominio de la memoria episódica (o declarativa), en el aprendizaje espacial, en la memoria de trabajo y la atención. Sin embargo, dichos cambios pueden manifestarse con cierta variabilidad entre individuos, debido a factores como la educación, la inteligencia y la estimulación mental, que permiten que el cerebro se adapte al daño patológico y mantenga la función cognitiva (Bettio et al., 2017).

El deterioro cognitivo implica manifestar al menos dos de las siguientes características (McKhann et al., 2011):

- a) Deterioro de la capacidad para adquirir y recordar información nueva. Los síntomas incluyen: preguntas o conversaciones repetitivas, extravío de objetos personales, olvido de acontecimientos o citas, o pérdida en una ruta familiar.
- b) Deterioro del razonamiento y del manejo de tareas complejas (falta de criterio). Los síntomas incluyen: escasa comprensión de los riesgos de seguridad, incapacidad para gestionar las finanzas, escasa capacidad para tomar decisiones e incapacidad para planificar actividades complejas o secuenciales.
- c) Deterioro de las capacidades visuoespaciales. Los síntomas incluyen: incapacidad para reconocer rostros u objetos comunes o para encontrar objetos a la vista directa a pesar de tener buena agudeza visual, incapacidad para operar instrumentos simples u orientar la ropa según el cuerpo.

d) Funciones del lenguaje deterioradas (hablar, leer, escribir). Los síntomas incluyen: dificultad para pensar en palabras comunes mientras se habla, vacilaciones, errores de habla, ortografía y escritura.

e) Cambios en la personalidad o la conducta. Los síntomas incluyen: fluctuaciones inusuales del estado de ánimo como agitación, deterioro de la motivación, iniciativa, apatía, pérdida de impulso, aislamiento social, disminución del interés en actividades anteriores, pérdida de empatía, comportamientos compulsivos u obsesivos, y comportamientos socialmente inaceptables.

En términos generales, el deterioro cognitivo se puede dividir en: DCL y demencia, según la gravedad de la disfunción (Han et al., 2022). El DCL, también llamado trastorno neurocognitivo leve (NCD) en el DSM-5, puede tener numerosas etiologías, incluida la depresión, pero también puede anunciar la etapa inicial de un trastorno demencial. En comparación con los adultos mayores sanos, los pacientes con DCL tienen un mayor riesgo de desarrollar demencia. Algunos pacientes con DCL vuelven a la normalidad, otros permanecen estables y aproximadamente el 10-20% por año se convierte en demencia, con algunas variaciones en la tasa dependiendo del seguimiento (Scharre & Trzepacz, 2013).

La evaluación neuropsicológica facilita la diferenciación del DCL, la demencia y la depresión. Una batería de pruebas completa incluye mediciones de la capacidad intelectual inicial, la atención, la función ejecutiva, la memoria, el lenguaje, las habilidades visuoespaciales y el estado de ánimo. También se incluyen mediciones basadas en informantes de los síntomas neuropsiquiátricos, las conductas y la competencia en la actividad instrumental (Nelson & O'Connor, 2008). Si los resultados de las pruebas neuropsicológicas están dentro de los rangos normales, pero las pruebas de neuroimagen o de laboratorio muestran evidencia de una enfermedad particular, como la EA, entonces se diagnostica EA preclínica (Sperling et al., 2011). Cuando el deterioro cognitivo progresa a un estado de deterioro objetivo, pero aún está lejos de la expresión completa, este estado prodrómico se diagnostica más comúnmente como DCL (Jack et al., 2011). Cuando el deterioro cognitivo se vuelve tan grave que interfiere con actividades de la vida diaria, como comer, asearse o desplazarse por entornos familiares, entonces a estos individuos con expresión completa de la enfermedad se les diagnostica demencia (Montine et al., 2021). Cuando solo hay alteración del lenguaje, se denomina afasia y no demencia. Por lo general, la demencia implica una alteración de la memoria y de otros dominios cognitivos, como las funciones ejecutivas, del lenguaje o visuoespaciales. Es común que se presenten características neuropsiquiátricas, como depresión, desinhibición, ansiedad, psicosis, apatía, conductas inquietas, impulsividad, rasgos obsesivo-compulsivos, trastornos del sueño y del apetito y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

agitación (Scharre & Trzepacz, 2013). La EA es el tipo más común de demencia (70% de los casos), seguida de la demencia vascular (25-30% de los casos) (Tadic et al., 2016).

Si bien la evaluación y los biomarcadores pueden ayudar a determinar la causa del DCL, en hasta la mitad de los casos el DCL no se debe a una afección progresiva o neurodegenerativa. Por lo tanto, el curso de la enfermedad es inestable en muchos casos. Las causas incluyen afecciones reversibles como la depresión, el uso de fármacos anticolinérgicos, opioides y benzodiazepinas, deficiencia de tiamina, deshidratación, desnutrición, convulsiones e hipotiroidismo, así como afecciones degenerativas demenciales (Scharre & Trzepacz, 2013). En cuanto a la demencia, puede haber muchas etiologías. Las enfermedades neurodegenerativas (EA, demencia de Parkinson y de cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal) son las causas más comunes de demencia junto con la demencia vascular. Las causas menos comunes incluyen hidrocefalia de presión normal, inmunológica/inflamatoria (lupus eritematoso sistémico, vasculitis, paraneoplásica, esclerosis múltiple), infecciosa (prión, sífilis, VIH, herpes), anoxia, apnea obstructiva del sueño, postraumática, neoplásica (SNC y metastásica), tóxica/metabólica (hipotiroidismo, inducida por fármacos, uremia, encefalopatía hepática), deficiencias de vitaminas (B12, folato, tiamina, niacina), enfermedad de Huntington, inducida por alcohol y la demencia depresiva (Knopman et al., 2001; Scharre & Trzepacz, 2013).

2.1.4 INTERVENCIONES PARA DETENER EL DETERIORO COGNITIVO

Existe una amplia investigación sobre tratamientos que buscan prevenir el deterioro cognitivo en adultos mayores, mejorar la cognición o atenuar el deterioro ya presente en personas con DCL o demencias. Las intervenciones varían desde medidas de estilo de vida hasta el uso de fármacos. Respecto a estos últimos, algunos estudios discuten el poco beneficio de los tratamientos farmacológicos disponibles para la prevención del deterioro cognitivo en personas con cognición normal o DCL; además de la falta de intervenciones efectivas para modificar de forma significativa las alteraciones que se producen ante la demencia (Feldman et al., 2014; Fink et al., 2018).

Los estudios epidemiológicos sugieren que las medidas dietéticas, el ejercicio físico y la actividad mental pueden reducir el riesgo de deterioro cognitivo y EA en adultos mayores (Andrade & Radhakrishnan, 2009). En hombres y mujeres de 65 años o más, la ingesta diaria de frutas y verduras y la ingesta semanal de pescado se

asocian a una reducción del 30%-40% del riesgo de demencia y EA (Barberger-Gateau et al., 2007). Así mismo, estudios realizados en animales muestran que las dietas ricas en ácidos grasos omega-3 tienen muchos beneficios para el SNC, brindando protección contra el estrés oxidativo, la reducción de la plasticidad y el deterioro de la capacidad de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris (Wu et al., 2004) u otros laberintos (Lim & Suzuki, 2001); mejorando el flujo sanguíneo cerebral (Tsukada et al., 2000) o modificando la neurotransmisión en regiones como el hipocampo (Itokazu et al., 2000). Dichos efectos son atribuidos principalmente al ácido docosahexaenoico (DHA), que es un componente importante de los fosfolípidos de membrana en el cerebro y se encuentra en altos niveles en regiones metabólicamente activas como la corteza cerebral (M. C. Morris et al., 2003). Así mismo, gran cantidad de evidencia sugiere que niveles más altos de actividad física también reducen el riesgo de demencia, ya que el ejercicio facilita la neuroplasticidad en el cerebro (Larson et al., 2006; Ravaglia et al., 2008). Un estudio realizado en ratas adultas demostró que correr aumentaba la densidad de espinas dendríticas tanto en las neuronas granulares del GD, como en las neuronas piramidales CA1 y en las neuronas piramidales de la capa III de la corteza entorrinal; cambios que pueden contribuir a mejoras en el rendimiento de aprendizaje y memoria en tareas dependientes del hipocampo (Stranahan et al., 2007).

La hipótesis colinérgica de la demencia implica la degeneración de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal como una característica patológica central de la EA. Por lo tanto, el desarrollo de fármacos para la demencia se ha centrado en corregir el déficit colinérgico mediante la utilización de una de las siguientes tres estrategias: el suministro de agentes precursores para aumentar la producción de acetilcolina (ACh); el agonismo colinérgico para compensar el déficit de ACh y la inhibición de la colinesterasa para aumentar la disponibilidad de ACh. Los fármacos colinérgicos que actualmente cuentan con la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para la EA son la tacrina, el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina. La memantina, que actúa sobre los receptores NMDA, es otro fármaco aprobado por la FDA. Así mismo, los tratamientos experimentales para los déficits cognitivos incluyen el extracto de ginkgo biloba, la fototerapia, la melatonina, la vitamina E y la estimulación nerviosa eléctrica transcutánea (TENS) (Andrade & Radhakrishnan, 2009).

2.1.5 ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

Aunque el envejecimiento humano impacta a todo el organismo, el envejecimiento del cerebro es especialmente relevante. A diferencia de otros órganos, sus células, las neuronas, son células postmitóticas altamente diferenciadas, cuya esperanza de

vida, en la mayoría de los casos, coincide con la esperanza de vida del organismo completo (Isaev et al., 2019). A través de la secuenciación del genoma completo de una sola célula, se ha encontrado una acumulación de mutaciones somáticas con la edad en neuronas humanas postmitóticas de la corteza prefrontal y el hipocampo (Lodato et al., 2018). Estas alteraciones se han relacionado con el deterioro cognitivo relacionado con la edad y las enfermedades neurodegenerativas (Van Veluw et al., 2012).

Estudios adicionales que emplearon resonancia magnética para analizar el efecto del envejecimiento en las redes cerebrales sugieren que los patrones funcionales y estructurales de conectividad del cerebro cambian con la edad. En los adultos mayores, se observa una menor conectividad dentro de las redes cerebrales, lo que refleja una disminución en la eficiencia de estas y diferencias en la dinámica cerebral. Esta reducción en la conectividad funcional parece estar vinculada al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento (Damoiseaux, 2017).

Por otro lado, la investigación sobre el envejecimiento cerebral ha demostrado que, en el proceso de envejecimiento normal, no se produce una pérdida significativa de neuronas de forma general. Sin embargo, pueden observarse reducciones en el número, diámetro, longitud y ramificación de las dendritas, así como en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas (Duan et al., 2003; Isaev et al., 2019; Page et al., 2002). Cabe señalar que estos cambios pueden presentarse de forma muy heterogénea en las diferentes regiones del cerebro, y existe evidencia de que una disminución en el número de neuronas está presente de forma local en regiones específicas de la corteza de primates envejecidos (Smith et al., 2004). Así mismo, otros estudios han encontrado que la muerte neuronal varía en las diferentes regiones del cerebro durante el envejecimiento, afectando con ello el volumen cerebral en diferentes estructuras. Entre las regiones más afectadas, se encuentran la corteza frontal y temporal, el putamen, el tálamo y el núcleo accumbens (Fjell & Walhovd, 2010). De hecho, se ha propuesto que el declive cognitivo asociado a la edad no es resultado de una alteración homogénea de la función cerebral, sino que se produce por alteraciones independientes en algunas regiones cerebrales (Barensse et al., 2002).

Otra estructura cuyo volumen se ve afectado es el hipocampo, una región cerebral reconocida por su capacidad de llevar a cabo la neurogénesis. En esta área, la muerte neuronal podría ser parcialmente compensada gracias a este proceso. Sin embargo, se ha demostrado que, con el proceso de envejecimiento, la neurogénesis se reduce significativamente (Driscoll et al., 2006; Fjell & Walhovd, 2010; Isaev et al., 2019). El hipocampo, ampliamente reconocido por su papel clave en el

aprendizaje y la consolidación de la memoria, está asociado con la regulación de diversas funciones cognitivas, pero su funcionamiento se deteriora como consecuencia del envejecimiento (Baxter, 2003).

2.2 HIPOCAMPO

El hipocampo humano es una estructura alargada ubicada profundamente en el lóbulo temporal medial (LTM). Su forma, que en las disecciones macroscópicas recuerda a un caballito de mar, inspiró su nombre, en referencia a este organismo marino del género *Hippocampus*. En los roedores, el hipocampo es relativamente grande y se encuentra ubicado justo debajo del neocórtex (Knierim, 2015). Aunque el hipocampo humano es aproximadamente 100 veces más grande que el de las ratas, la disposición de sus células y fibras es similar en todos los mamíferos (Andersen et al., 2007). En las ratas se ha demostrado previamente que el volumen general del hipocampo y su densidad neuronal disminuye con la edad, lo cual está correlacionado con déficits de rendimiento en tareas dependientes del hipocampo (Driscoll et al., 2006).

Los estudios iniciales sobre el paciente HM revelaron que el hipocampo y las estructuras adyacentes del LTM son fundamentales para la memoria. Después de la extirpación quirúrgica de gran parte del LTM bilateral para tratar su epilepsia resistente a los medicamentos, HM desarrolló una amnesia anterógrada severa. Estas primeras observaciones y las investigaciones posteriores sobre el caso de HM brindaron una evidencia sólida de que las estructuras dentro del LTM tienen un papel crucial en la memoria declarativa, aquella que nos permite recordar hechos y eventos cotidianos (Preston & Eichenbaum, 2013). Las principales funciones atribuidas al hipocampo incluyen la consolidación de recuerdos declarativos (episódicos) y el aprendizaje espacial dependiente del contexto, así como la regulación de las conductas emocionales (El-Falougy & Benuska, 2006). La integridad estructural y funcional del hipocampo es crucial para el aprendizaje normal y la consolidación de la memoria, y esta estructura es particularmente vulnerable al proceso de envejecimiento. Muchos de los déficits cognitivos que se observan con el envejecimiento pueden reflejarse en modelos animales que presentan daño hipocampal bilateral, lo que respalda el papel clave del hipocampo en el envejecimiento y la cognición (Bettio et al., 2017; Driscoll et al., 2003).

El hipocampo es parte de una red funcional en el cerebro conocida como la formación hipocampal, que incluye varias áreas cerebrales: el GD, el hipocampo, el subíulum, el presubíulum, el parasubíulum y la corteza entorrinal (CE). La

estructura del hipocampo se divide en tres subregiones principales: CA1, CA2 y CA3, donde "CA" proviene de *cornu ammonis*, nombre dado a esta estructura por su semejanza con los cuernos de carnero, símbolo de la deidad egipcia Amón (Andersen et al., 2007).

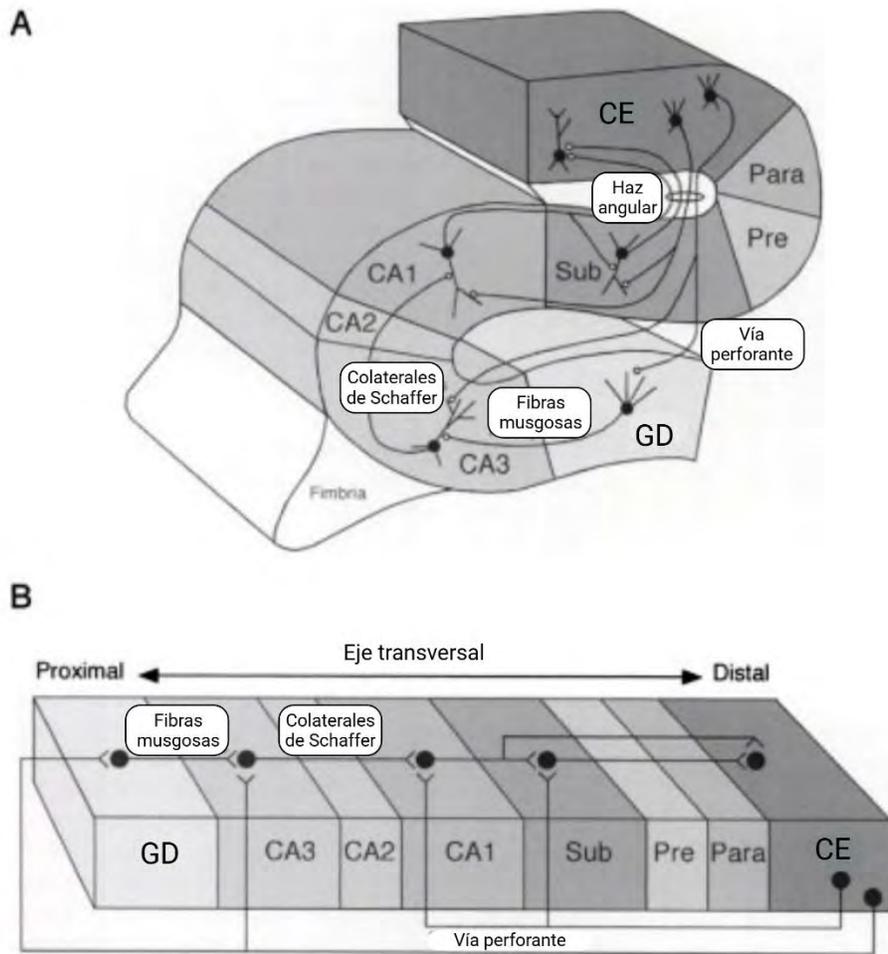


Fig. 5. Anatomía de la formación hipocampal (Adaptado de Andersen, et al., 2007). La información entra al hipocampo desde la corteza entorrinal que se proyecta al GD, CA3 y CA1. Las células granulares del GD se proyectan hacia la región CA3 del hipocampo a través de las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 se proyectan hacia CA1 a través de la vía de las colaterales de Schaffer. La información sale del hipocampo desde CA1 mediante proyecciones a la corteza entorrinal y el subículo. CA1: Cuerno de Amón 1, CA2: Cuerno de Amón 2, CA3: Cuerno de Amón 3, CE: corteza entorrinal, GD: giro dentado, Pre: presubículo, Para: parasubículo, Sub: subículo.

El hipocampo recibe la mayor parte de la información cortical de la CE, que se compone de dos regiones cerebrales distintas en las ratas: la corteza entorrinal medial (CEM) y la corteza entorrinal lateral (CEL). La CEM (especialmente sus regiones más caudales) está asociada con las regiones de procesamiento espacial del cerebro, mientras que la CEL recibe información multisensorial y puede responder a estímulos olfativos, visuales y auditivos (Canto et al., 2008; C. Wang et al., 2024). Ambas regiones se proyectan hacia el hipocampo a través de la vía perforante, integrada por fibras que atraviesan el subículo de la formación hipocámpal. En general, las neuronas de la capa II de la CE se proyectan hacia el GD y CA3, mientras que la capa III de la CE se proyecta hacia CA1 y el subículo (Andersen et al., 2007; Knierim, 2015). Las células granulares del GD se proyectan a la región CA3 a través de la vía de las fibras musgosas y, por su parte, las neuronas piramidales de CA3 se proyectan a la región CA1 a través de la vía colateral de Schaffer. Los axones de CA3, además de sus proyecciones a CA1, envían colaterales que forman sinapsis con otras neuronas de CA3. Finalmente, la región CA1 se proyecta de nuevo a la corteza entorrinal, completando el circuito (Knierim, 2015) (**Fig. 5**).

Desde hace mucho tiempo se conoce que pacientes con EA presentan alteraciones patológicas en la vía perforante que impiden el funcionamiento normal del hipocampo y explican el deterioro de la memoria que se presenta en esta enfermedad (Hyman et al., 1986). De hecho, una característica definitoria de la EA es la acumulación de tau y β -amiloide que comienza en la CE y se extiende a la corteza y al propio hipocampo (Culig et al., 2022). Así mismo, la pérdida sináptica de la vía perforante se ha relacionado tanto con la EA como con el deterioro cognitivo en personas con 90 años o más (Robinson et al., 2014).

Además de la CE, el hipocampo recibe entradas corticales directas de la corteza perirrinal y la corteza postrinal. También, recibe importantes entradas subcorticales del septo medial, el locus coeruleus, el núcleo del rafe, el núcleo reuniens y la amígdala (Knierim, 2015). Las fibras provenientes de estas áreas subcorticales acceden a la formación hipocámpal a través del fórnix, que actúa como la principal vía aferente y eferente del hipocampo y forma parte esencial del Circuito de Papez. Como vía eferente, el fórnix comienza en la fimbria, la sustancia blanca que recubre el hipocampo, y luego se divide en fibras precomisurales, que inervan los núcleos septales, la banda diagonal de Broca y el núcleo accumbens; y fibras poscomisurales, que se extienden hacia los cuerpos mamilares del diencefalo. Estas fibras poscomisurales se subdividen en dos haces: uno que conecta con diversas áreas del hipotálamo anterior y otro que lleva fibras hacia los núcleos talámicos anteriores (Benear et al., 2020). Las lesiones en el fórnix dan lugar a una amnesia anterógrada irreversible (Park et al., 2000; Poreh et al., 2006). La

investigación que utiliza métodos de imagenología *in vivo* ha vinculado la patología del fórnix con el envejecimiento cognitivo, el DCL y la EA (Benear et al., 2020). Además, una parte del hipocampo (la parte ventral en ratas; anterior en humanos) envía salidas a la corteza prefrontal medial, área que también se ha vinculado con la consolidación de la memoria (Preston & Eichenbaum, 2013).

Por su parte, el GD hipocampal es una estructura clave del sistema nervioso, ya que es una de las pocas regiones cerebrales que conserva la capacidad de generar nuevas neuronas funcionales en la adultez (Van Praag et al., 2002). En los mamíferos, la neurogénesis adulta está restringida a dos áreas del cerebro: la zona subgranular (SGZ) del GD y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales. Este proceso ha sido demostrado tanto en roedores como en humanos (Lie et al., 2004). En el GD, las nuevas neuronas se originan en la SGZ y migran hacia la capa granular, donde desarrollan arborización dendrítica y se integran a los circuitos neuronales existentes, contribuyendo a la función del hipocampo (Bettio et al., 2017). La evidencia actual sugiere que estas neuronas pueden participar en funciones dependientes del hipocampo, como la codificación de la memoria y la regulación del estado de ánimo (Toda et al., 2019). Es importante destacar que este proceso es susceptible al envejecimiento, ya que se ha demostrado que la capacidad de generar nuevas neuronas disminuye con la edad. Más allá de otros cambios asociados al envejecimiento en el hipocampo, esta reducción en la neurogénesis se ha correlacionado estrechamente con los déficits de memoria en tareas que dependen de esta región del cerebro (Driscoll et al., 2006).

En los primates, todo el hipocampo se encuentra ubicado ventralmente en el LTM y se dispone principalmente en una orientación anteroposterior. En roedores, este eje suele denominarse eje dorso-ventral. El hipocampo anterior en primates corresponde al hipocampo ventral de los roedores, mientras que el hipocampo posterior en primates equivale al hipocampo dorsal de los roedores. En los roedores, las regiones dorsal y ventral desempeñan funciones diferenciadas en la memoria y en la cognición espacial y emocional (Knierim, 2015). Se ha sugerido, que la región dorsal del hipocampo está involucrada en el procesamiento y la memoria espacial, mientras que la región ventral juega un papel fundamental en la regulación de emociones, como la ansiedad (Bannerman et al., 2003, 2004).

2.3 APRENDIZAJE Y MEMORIA

La cognición es el conjunto de procesos mentales involucrados en la adquisición y comprensión del conocimiento a través del pensamiento, el aprendizaje, la memoria

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y la percepción. El aprendizaje se refiere al proceso de adquirir nueva información, mientras que la memoria abarca su consolidación, almacenamiento y recuperación. Aunque estos conceptos son distintos, suelen usarse indistintamente, especialmente en estudios con animales, debido a su estrecha interdependencia y la dificultad para analizarlos por separado (Tan et al., 2022). El aprendizaje es omnipresente en los animales, desde los protozoos hasta los primates (Schausberger & Peneder, 2017). Tanto el aprendizaje como la memoria son fundamentales para la supervivencia de los organismos, ya que facilitan la conservación de conductas basadas en experiencias previas. En animales silvestres, estos procesos están directamente relacionados con la rapidez de respuesta ante estímulos de depredación, lo que influye en sus probabilidades de supervivencia (Maille & Schradin, 2016).

Desde una perspectiva neuronal, el aprendizaje es el proceso mediante el cual una red neuronal se modifica para adaptarse a las experiencias y al entorno. Esto ocurre a través de cambios en las sinapsis, lo que permite al cerebro almacenar y procesar nueva información. Por su parte, la memoria representa el estado de mantenimiento de dicha red neuronal después de haber aprendido algo. Es decir, las conexiones sinápticas que quedan como resultado de esos cambios y que permiten que la información aprendida se conserve y se recupere más tarde (Ma & Zuo, 2022). Para su almacenamiento, la información primero se codifica en circuitos sinápticos y redes neuronales, donde se producen cambios estructurales tanto a nivel celular como en los circuitos cerebrales. Posteriormente, la información se almacena a corto plazo y pasa por un proceso de consolidación para formar memorias a largo plazo. Una vez consolidadas, estas memorias pueden ser recuperadas o evocadas cuando sea necesario (Brem et al., 2013).

El aprendizaje se puede clasificar en dos tipos: asociativo y no asociativo. El aprendizaje asociativo ocurre cuando un cambio en la conducta resulta de la experiencia simultánea de dos o más eventos que se perciben como relacionados en el tiempo. Este tipo de aprendizaje incluye el condicionamiento clásico (Pavloviano), donde un estímulo inicialmente neutro se asocia con un estímulo significativo hasta que genera una respuesta por sí mismo, y el condicionamiento operante (instrumental), donde el comportamiento se fortalece o debilita según las consecuencias que produce, mediante refuerzos positivos o negativos. En contraste, el aprendizaje no asociativo se basa en una modificación conductual tras la repetición de un solo evento con la misma frecuencia e intensidad a lo largo del tiempo. El aprendizaje no asociativo incluye la sensibilización, que es el aumento de la respuesta ante un estímulo tras varias exposiciones, especialmente si el estímulo es intenso o percibido como amenazante, y la habituación, que implica la

disminución de la respuesta ante un estímulo que se repite y que no tiene un significado importante (Schausberger & Peneder, 2017).

La memoria se puede clasificar según su duración, distinguiéndose entre la memoria primaria (a corto plazo), que es transitoria, y la memoria secundaria (a largo plazo), que es permanente (Brem et al., 2013). En la memoria a corto plazo, varios sistemas de memoria intervienen en la retención de fragmentos de información durante un tiempo relativamente breve, generalmente hasta 30 segundos. En contraste, la memoria a largo plazo tiene una capacidad prácticamente ilimitada y puede almacenar información que perdura durante años (Cascella & Al Khalili, 2025). La teoría de la consolidación de sistemas de la memoria plantea que la preservación de los recuerdos a lo largo del tiempo requiere modificaciones en los circuitos y redes cerebrales. Este proceso depende de cascadas de señalización que conducen a modificaciones postraduccionales, regulación de la expresión génica y síntesis de proteínas, lo que finalmente permite la estabilización de los circuitos neuronales (Tonegawa et al., 2018). A nivel molecular, la memoria a largo plazo se distingue de la memoria a corto plazo por su necesidad de expresión de nuevos genes (Sudhakaran & Ramaswami, 2017).

Existen diversos sistemas de memoria, los cuales se dividen en dos grandes categorías: memoria explícita (declarativa) y memoria implícita (no declarativa). La memoria explícita permite recordar conscientemente hechos, eventos o información específica, y es accesible verbalmente. Por otro lado, la memoria implícita influye en el comportamiento de manera automática, sin necesidad de conciencia o acceso directo a la información, y se manifiesta a través de cambios en las respuestas o habilidades adquiridas. Mientras que la memoria explícita involucra recuerdos que se pueden acceder conscientemente, la memoria implícita afecta nuestras acciones sin requerir conciencia directa (Dickerson & Eichenbaum, 2010).

Los procesos de aprendizaje y memoria están estrechamente relacionados con la interacción de diversas regiones y redes cerebrales. Por ello, uno de los modelos más reconocidos sobre los sistemas de memoria establece una correspondencia entre las clasificaciones propuestas y las estructuras neuroanatómicas que sirven de base para su funcionamiento. La memoria declarativa se divide en memoria episódica, que guarda experiencias personales, y memoria semántica, que almacena conocimientos generales. Estas formas de memoria están moduladas por el LTM (que incluye la formación hipocampal) y el diencéfalo (Squire et al., 2004). La memoria no declarativa abarca varias formas de aprendizaje, como el procedimental, que implica aprender secuencias de movimientos o acciones, como golpear un palo de golf, andar en bicicleta o conducir un automóvil. Este tipo de

aprendizaje depende de los sistemas corticoestriatales y se ve afectado por trastornos como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. Otro tipo de memoria no declarativa es la memoria emocional, que implica cambios en la aproximación o evitación de estímulos previamente neutrales, como la preferencia por ciertos alimentos o la aversión a objetos con los que se tuvo una experiencia desagradable. La memoria emocional depende de las interacciones subcorticales y corticales con la amígdala, y se altera en trastornos como el pánico, las fobias y otros trastornos neuropsiquiátricos (Dickerson & Eichenbaum, 2010). Otros ejemplos de memoria no declarativa y las estructuras cerebrales asociadas se incluyen en la **Fig. 6**.

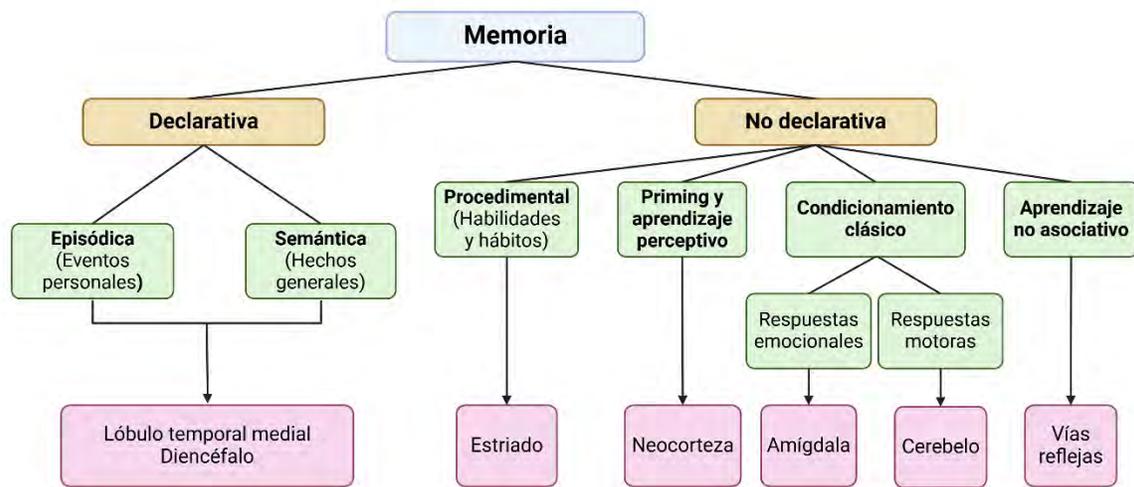


Fig. 6. Taxonomía de los sistemas de memoria en mamíferos según Squire, 2004 (Creado en BioRender.com). Uno de los modelos más reconocidos sobre los sistemas de memoria, establece una correspondencia entre las clasificaciones propuestas y las estructuras neuroanatómicas que sirven de base para su funcionamiento.

Se ha estudiado ampliamente la posibilidad de que las diferentes estructuras del LTM, como la corteza perirrinal, la corteza parahipocámpica y el hipocampo, contribuyen a la memoria declarativa de diferentes maneras, dependiendo del tipo de información que se procesa (por ejemplo, visual o espacial). En monos, la corteza perirrinal está más involucrada en la memoria visual, ya que recibe proyecciones de áreas del cerebro relacionadas con la vista. Por otro lado, la corteza parahipocámpica está más relacionada con la memoria espacial y recibe proyecciones de áreas vinculadas a la orientación y el espacio, como la corteza parietal posterior y la corteza retrosplenial. El hipocampo, que recibe información de estas áreas, juega un papel crucial en la integración de múltiples tipos de información para tareas como recordar eventos específicos (memoria episódica) o

asociar diferentes elementos (por ejemplo, recordar un nombre junto con una cara) (Squire, 2004).

2.3.1 MEMORIA ESPACIAL

La memoria espacial se considera una memoria de tipo declarativa en humanos, mediante la cual el cerebro almacena información relacionada con la ubicación física de los objetos en el espacio, por lo que está asociada con mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y referencias espaciales (Kessels et al., 2001). En los animales, este tipo de memoria resulta esencial para una gran variedad de conductas como la búsqueda de alimento, la conducta reproductiva y parental, el regreso al nido o la huida de depredadores (Oliveira-Santos et al., 2016). La navegación es tan vital para la supervivencia que se conserva en filos tan básicos como los insectos, incluidas las hormigas y las abejas, las aves, los peces, los murciélagos y todos los mamíferos terrestres (Vorhees & Williams, 2014).

La navegación espacial se fundamenta en señales dinámicas de movimiento propio y señales ambientales estáticas. Las primeras incluyen la retroalimentación vestibular, la copia de referencia motora y las señales propioceptivas, las cuales permiten monitorear la posición y orientación del cuerpo. Estas señales se procesan inicialmente en los núcleos del tronco encefálico y luego en las cortezas temporales y parietales superiores, brindando una percepción integrada del movimiento. En cuanto a las señales ambientales, estas comprenden objetos estables, como puntos de referencia y límites del entorno, que facilitan la determinación de la posición del individuo en relación con su espacio circundante. Aunque en los primates estas señales provienen principalmente de la visión, otras especies también utilizan señales auditivas, olfativas y táctiles. La percepción de estas señales activa áreas de la corteza parietal posterior y puede generar marcos de referencia alocéntricos (independientes de la posición del navegante) o egocéntricos (relacionados con la posición del navegante) (Lester et al., 2017). La navegación egocéntrica puede funcionar en la oscuridad, lo que indica que las señales visuales no son esenciales para este método de navegación. Por el contrario, la navegación alocéntrica se ve deshabilitada por la ausencia de señales visuales. La navegación egocéntrica involucra el cuerpo estriado dorsal y las estructuras conectadas; en los humanos, este sistema codifica rutas y caminos integrados y, cuando se sobre aprende, se convierte en memoria procedimental. La navegación alocéntrica por su parte involucra al hipocampo, la CE y las estructuras circundantes; en los humanos, este sistema codifica además la memoria semántica y episódica (Vorhees & Williams, 2014).

Así, se ha identificado que varias áreas cerebrales desempeñan un papel clave en la cognición espacial. Otra estructura que se ha relacionado es la corteza prefrontal (DiMattia & Kesner, 1988; Kessels et al., 2000), un área cerebral que almacena y organiza la información espacial visual para ser utilizada en tareas de memoria de trabajo. En la corteza prefrontal de los primates, las neuronas poseen campos de memoria especializados en recordar ubicaciones espaciales durante un periodo limitado y mantienen la información visual disponible para la toma de decisiones o la ejecución de movimientos. Un experimento realizado con monos demostró que estas neuronas se activan cuando los animales realizan tareas que requieren recordar ubicaciones específicas de objetos en un entorno visual (Funahashi et al., 1989). Este tipo de memoria está asociado con la memoria de trabajo, que permite retener y manipular información de manera temporal mientras se lleva a cabo una tarea. En particular, la memoria a corto plazo para la ubicación espacial no depende de un hipocampo intacto en primates, lo que respalda la idea de una cierta independencia entre estos sistemas (Baxter, 2003).

De las estructuras cerebrales implicadas en la memoria espacial, la formación hipocampal ha sido la región que ha atraído mayor atención de los neurocientíficos cognitivos (Kessels et al., 2001). La evidencia a través de estudios de lesión, electrofisiológicos y de neuroimagen implican al hipocampo como una estructura clave para la memoria espacial y la navegación (Winocur et al., 2005). Los primeros síntomas que suelen presentar los pacientes con daño en el LTM (dentro del cual se encuentra el hipocampo), debido a enfermedades progresivas como la EA, son dificultades en la memoria espacial y episódica. En los seres humanos, se ha observado que la memoria espacial está principalmente asociada con el hemisferio derecho, mientras que la memoria verbal o narrativa se vincula con el hemisferio izquierdo (Burgess et al., 2002). El consenso actual sostiene que el hipocampo humano es crucial para la memoria episódica. Las neuronas del hipocampo se encargan de codificar episodios de memoria y realizar asociaciones complejas de información espacial y/o temporal, siendo responsables de almacenar recuerdos relacionados con eventos específicos, como el lugar y el momento en que ocurrieron; por lo tanto, sirve como sustrato neuronal para los recuerdos episódicos (Baxter, 2003; Sugar & Moser, 2019).

La teoría del mapa cognitivo postula que el hipocampo apoya específicamente el procesamiento aloécéntrico del espacio en contraste con otras regiones del cerebro, como el neocórtex parietal, que apoyan el procesamiento egocéntrico (Burgess et al., 2002). O'Keefe y Dostrovsky (1971), utilizando un conjunto de microelectrodos implantados en cerebros de ratas, descubrieron que las neuronas del hipocampo aumentan sus tasas de activación cuando el animal atraviesa regiones específicas

de su entorno, proporcionando un mapa dependiente del contexto (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Estas neuronas con patrones de activación específicos de la ubicación se denominaron posteriormente "células de lugar". Las células de lugar se han estudiado más ampliamente en ratas y ratones, pero también se encuentran en el hipocampo humano (Cobar et al., 2017; Ekstrom et al., 2003), así como en otras especies de mamíferos, como murciélagos y primates no humanos (Lester et al., 2017). Se cree que el envejecimiento podría modificar el patrón de activación de las células de lugar, aunque los datos no son totalmente concluyentes (Tanila et al., 1997).

Así mismo, se ha identificado que la CEM, especialmente en la capa II, tiene células de lugar y se comunica con las células de lugar en el hipocampo (Hafting et al., 2005). También existen células de cuadrícula en la CE que mapean regiones más grandes del entorno que las células de lugar (Leutgeb et al., 2005). Además, la CE, junto con el presubiculo y el parasubiculo, contienen células de dirección de la cabeza que desempeñan un papel clave en la orientación del organismo a las señales distales y contribuyen a la dirección del movimiento (Buzsáki & Moser, 2013). Por otro lado, se ha descubierto que la CEM contiene células fronterizas que reaccionan a los límites o bordes dentro del entorno (Solstad et al., 2008). En conjunto, las células de lugar, cuadrícula, dirección de la cabeza y borde de la CE, así como las células de lugar del hipocampo forman una red funcional que mapea lugares en el espacio fuera del organismo (Vorhees & Williams, 2014).

El deterioro de la memoria espacial y de las capacidades de navegación es común durante el envejecimiento de los mamíferos y ha sido bien caracterizado en muchos estudios (**Tabla 1**). Aunque las funciones visuales básicas, como la percepción de distancia y objetos, se mantienen en los adultos mayores, presentan deficiencias en el procesamiento vestibular, la percepción del movimiento propio y la integración de trayectorias. Además, en el envejecimiento normal hay un marcado déficit en el procesamiento espacial aloentróico y una tendencia hacia estrategias egocéntricas, lo que afecta negativamente su desempeño en la navegación espacial. También experimentan problemas para codificar y recuperar información espacial en la memoria a largo plazo (Li & King, 2019). En los humanos, la disminución de la capacidad de navegación debida al envejecimiento puede restringir gravemente la movilidad y la participación social (Lester et al., 2017). Los déficits espaciales se observan ampliamente en el envejecimiento normal y en las primeras etapas de la EA, lo cual se ha correlacionado a través de estudios de neuroimagen con atrofia del hipocampo (Li & King, 2019). La localización de los diferentes procesos de memoria, y la mejor comprensión de sus bases bioquímicas y fisiológicas, promete terapias farmacológicas que pueden reforzar los mecanismos neuronales que fallan en el envejecimiento (Baxter, 2003).

Tabla 1. La disminución de la memoria espacial es común durante el envejecimiento de los mamíferos

Especie	Edad	Sexo	Estudio
Humano	>65 años	Ambos	(Moffat et al., 2001)
Rata (Long-Evans)	28-34 meses	Machos	(Barnes, 1979)
Rata (Fischer 344)	21 meses	Machos	(Shukitt-Hale et al., 2004)
Humano	65-74 años	Ambos	(León et al., 2016)
Rata (Fischer 344)	21 meses	Hembras	(Luine et al., 2011)
Humano	>65 años	Mujeres	(Perrochon et al., 2018)
Mono Rhesus	20-31 años	Ambos	(Lacreuse et al., 2005)

En estudios con animales, se puede utilizar una amplia gama de evaluaciones experimentales para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo, tales como el laberinto de brazos radiales, el laberinto de Barnes, el laberinto acuático de Morris, pruebas de miedo contextual y pruebas de reconocimiento de objetos. Estas pruebas se basan en comportamientos observables que permiten inferir el funcionamiento de la memoria espacial en diferentes especies y son cruciales para entender los mecanismos neuronales implicados en la memoria espacial y su alteración en condiciones patológicas, como la EA o el daño cerebral relacionado con el hipocampo (Othman et al., 2022). El modelo más ampliamente utilizado es el laberinto acuático de Morris, que pone a prueba la capacidad espacial mediante la necesidad de que el sujeto se oriente en un espacio acuático y encuentre una plataforma sumergida. En esta prueba, los roedores deben usar pistas espaciales, como marcas visuales ubicadas alrededor de la piscina, para localizar la plataforma oculta. El rendimiento en esta tarea depende de la integridad del hipocampo, por lo que ha proporcionado información valiosa sobre cómo los déficits hipocámpales afectan la capacidad de los animales para aprender y recordar ubicaciones espaciales (Vorhees & Williams, 2014).

2.4 PLASTICIDAD NEURONAL

Una de las características más fascinantes del cerebro de los mamíferos es su plasticidad. Etimológicamente, plasticidad deriva del griego “plassein” que significa “moldear” (von Bernhardi et al., 2017). Así, la plasticidad neuronal, o neuroplasticidad, se refiere a la capacidad del sistema nervioso para modificarse y adaptarse a estímulos tanto internos como externos, reorganizando su estructura,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

conexiones y funciones (Cramer et al., 2011). Estos cambios pueden ocurrir en diversos niveles de organización del sistema nervioso, lo que nos permite hablar de diferentes tipos de plasticidad, como la tisular, neuronal, glial y sináptica, entre otras (von Bernardi et al., 2017). La capacidad del cerebro para modificar la actividad neuronal en respuesta a las experiencias influye en los pensamientos, sentimientos y comportamientos (Citri & Malenka, 2008).

En términos generales, el cerebro puede exhibir plasticidad como respuesta a demandas fisiológicas, variaciones en la actividad neuronal o daño en el tejido nervioso. Además, la plasticidad desempeña un papel clave en la formación de redes neuronales durante el desarrollo, así como en la adquisición de nuevos comportamientos motores y el aprendizaje a lo largo de la vida (Caroni et al., 2014). Este fenómeno abarca una amplia variedad de procesos biológicos, como la neurogénesis, la migración celular, los cambios en la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión, así como la creación de nuevas conexiones y la modificación de las ya existentes. La remodelación y el refinamiento de estas conexiones incluyen la formación y eliminación de sinapsis, la expansión y contracción de la arborización dendrítica, y el crecimiento y la poda axonal (von Bernardi et al., 2017).

La plasticidad estructural y funcional en las redes neuronales describe cómo las conexiones entre las neuronas se modifican en respuesta a la actividad cerebral. La plasticidad funcional se refiere a los cambios en la eficiencia de las sinapsis existentes, es decir, cómo las neuronas pueden volverse más o menos efectivas al transmitir señales. Este tipo de plasticidad puede ocurrir sin que haya modificaciones en el número, la ubicación, la densidad o el área de las sinapsis. Los ajustes en la transmisión neuronal pueden surgir de alteraciones en las moléculas presinápticas, postsinápticas o en el entorno extracelular. Por otro lado, la plasticidad estructural implica cambios más significativos en la conectividad neuronal, como la formación, eliminación o expansión de sinapsis (Fauth & Tetzlaff, 2016).

La plasticidad sináptica, un aspecto clave dentro de la neuroplasticidad, implica el cambio en la fuerza o eficacia de la transmisión en las sinapsis preexistentes, y se ha propuesto durante más de un siglo que juega un papel fundamental en la formación de recuerdos duraderos a partir de experiencias temporales (Citri & Malenka, 2008). La plasticidad sináptica se clasifica según la escala temporal de los cambios que se producen (De Pittà et al., 2016). En primer lugar, está la plasticidad de corto plazo, que involucra modificaciones que ocurren en milisegundos a minutos, como la depresión o facilitación de la liberación de neurotransmisores, lo que permite a las sinapsis realizar funciones críticas en los circuitos neuronales

(Abbott & Regehr, 2004). Luego, se encuentra la plasticidad a largo plazo, que abarca cambios que pueden durar desde horas hasta meses (Abraham, 2003), e incluye procesos como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), los cuales se asocian con el aprendizaje y la memoria (Martin et al., 2000).

La plasticidad homeostática es un proceso bien establecido que afecta tanto a las sinapsis como a las neuronas. Su función principal es permitir que los circuitos neuronales mantengan niveles adecuados de excitabilidad y conectividad, incluso frente a los cambios inducidos por la plasticidad dependiente de la experiencia (De Pittà et al., 2016; Turrigiano, 2011).

Durante el envejecimiento del cerebro humano, algunas regiones del ADN nuclear son especialmente susceptibles al daño oxidativo, lo que afecta principalmente a los promotores de genes involucrados en la plasticidad sináptica (Lu et al., 2004). En las neuronas del hipocampo, varios procesos dependientes del Ca^{2+} , esenciales para el aprendizaje y la memoria, sufren alteraciones relacionadas con la edad, lo que deteriora su neuroplasticidad. Entre estos cambios se incluyen una disminución en la potenciación a largo plazo (LTP) y un incremento en la depresión a largo plazo (LTD). Estos efectos contribuyen al deterioro general de la capacidad de adaptación y reorganización de las redes neuronales a medida que envejecemos (Thibault et al., 2001).

2.4.1 ESPINAS DENDRÍTICAS

Las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones que surgen de las dendritas neuronales, donde participan en procesos como la potenciación a largo plazo, la regulación de la dinámica del calcio y la amplificación de señales sinápticas. Estructuralmente, constan de una cabeza esférica ($<1\mu\text{m}$ de diámetro) que típicamente alberga una sinapsis excitadora, conectada a la dendrita por un cuello delgado ($<1\mu\text{m}$ de espesor y alrededor de $1\mu\text{m}$ de largo) (Yuste, 2013). Una de las características más llamativas de las espinas dendríticas es su diversidad morfológica (**Fig. 7**), que ha llevado a clasificarlas de acuerdo a su forma. La nomenclatura más comúnmente utilizada, introducida por Peters y Kaiserman-Abramof en 1970, las divide en tres categorías: cortas, delgadas y tipo hongo (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970); así mismo, pueden encontrarse ramificadas. Las espinas cortas carecen de una distinción clara entre cabeza y cuello. Las espinas delgadas presentan un cuello estrecho alargado y una cabeza pequeña y redondeada. Las de tipo hongo se caracterizan por una cabeza voluminosa y un

cuello corto y estrecho. Por su parte, las espinas ramificadas poseen bifurcaciones cerca de la base del cuello, dando lugar a dos o más cabezas (Arellano et al., 2007; Nimchinsky et al., 2002).

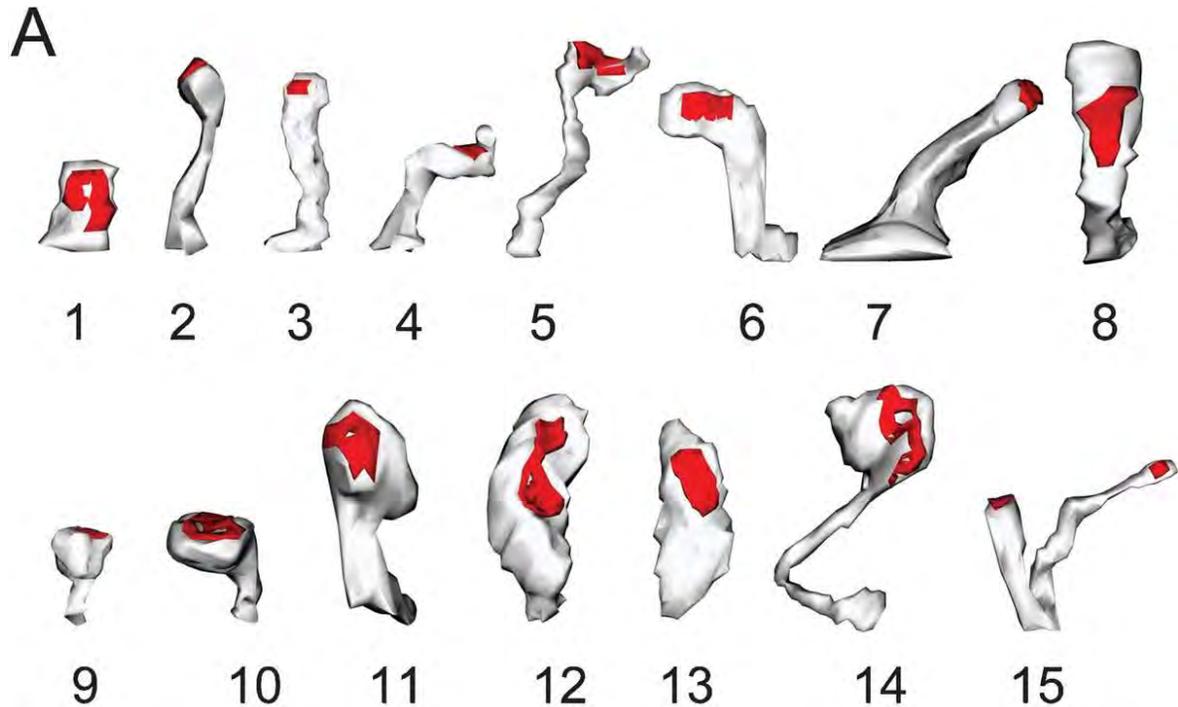


Fig. 7. Variabilidad morfológica de las espinas dendríticas (Tomado de Arellano et al., 2007). En la figura se muestran reconstrucciones tridimensionales de espinas dendríticas clasificadas como cortas (1), delgadas (2), con forma de hongo (9–11) y ramificadas (15), así como algunas morfologías atípicas que también pueden adoptar estas estructuras (3-8, 12-14).

Se ha propuesto que las espinas dendríticas delgadas y de tipo hongo están asociadas con procesos de aprendizaje y memoria (Aguilar-Hernández et al., 2020; Bourne & Harris, 2007; Mahmoud et al., 2015; Yuste & Bonhoeffer, 2001), mientras que las espinas cortas son el tipo predominante en las primeras etapas de desarrollo posnatal, donde podrían participar como formas inmaduras transitorias en procesos de plasticidad (Freire et al., 2011; Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020). Por su parte, las espinas bifurcadas podrían representar una adaptación estructural que favorece una mayor eficiencia en la comunicación sináptica, ya que cada cabeza tiene el potencial de establecer puntos de contacto sináptico independientes (Yuste & Bonhoeffer, 2001).

Cabe señalar que estas estructuras son altamente dinámicas; aparecen y desaparecen, acompañados por la formación y eliminación de sinapsis,

respectivamente; por lo que participan activamente en fenómenos relacionados con la plasticidad sináptica (Holtmaat & Svoboda, 2009). Los cambios en la forma y el tamaño de las espinas dendríticas se correlacionan con la fuerza de las conexiones sinápticas excitatorias y dependen, en gran medida, de la remodelación de su citoesqueleto de actina, principal responsable de mantener su forma y estructura (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Mediante técnicas como la microscopía electrónica, se ha demostrado que las espinas dendríticas contienen abundantes filamentos de actina, así como proteínas asociadas como miosina, debrina y espinofilina (neurabina II), que no solo contribuyen a su morfología, sino también a funciones fisiológicas como el anclaje de proteínas de membrana y el transporte intracelular de proteínas y vesículas (Edler et al., 2018; Ishikawa et al., 2007; Mizui et al., 2014; Terry-Lorenzo et al., 2005). El citoesqueleto de las espinas dendríticas también incluye otros componentes, como proteínas asociadas a microtúbulos (MAP2) y moléculas de adhesión celular, entre ellas cadherinas e integrinas, que participan en la estabilidad estructural y la señalización sináptica (DeGiosio et al., 2022; Koleske, 2013).

Tanto la morfología como el número de espinas dendríticas pueden modificarse en respuesta a múltiples factores, incluyendo la exposición a ambientes enriquecidos, los niveles hormonales, la administración de ciertos fármacos, así como procesos de aprendizaje y memoria (Leuner & Shors, 2004). Algunos estudios, por ejemplo, han demostrado que el aprendizaje induce un incremento en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo, lo cual se ha observado en tareas conductuales como el laberinto acuático de Morris (Gómez-Padilla et al., 2020). Asimismo, la edad constituye un factor determinante en la densidad de espinas dendríticas (Dickstein et al., 2013).

Durante el desarrollo y la etapa neonatal, el número de espinas dendríticas es elevado, favoreciendo la formación de nuevas conexiones sinápticas y alcanzando su máxima densidad alrededor de los 2 a 8 años. Durante la adolescencia, esta densidad disminuye de forma progresiva hasta alcanzar un nivel estable en la edad adulta (Khanal & Hotulainen, 2021). Sin embargo, durante el envejecimiento, se ha documentado una reducción adicional, particularmente en estructuras como el hipocampo y la corteza prefrontal, lo cual se ha relacionado con el deterioro cognitivo asociado a la edad (Dickstein et al., 2013; Kabaso et al., 2009; Morrison & Baxter, 2012). A pesar de ello, se ha demostrado que ciertos factores, como la estimulación cognitiva, el ejercicio físico y algunas intervenciones farmacológicas, pueden atenuar esta pérdida estructural, contribuyendo a preservar la plasticidad sináptica (Ettcheto et al., 2021; Jung & Herms, 2014; Li et al., 2022).

2.4.2 ESPINOFILINA

La espinofilina o neurabina II es una de las proteínas de unión a la actina (ABP) enriquecida en las espinas dendríticas, donde se une a la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Edler et al., 2018), una fosfatasa que regula la fosforilación y el tráfico de receptores de glutamato de tipo AMPA (AMPA) en la membrana plasmática (Lin & Webb, 2009). El gen de la espinofilina llamado PPP1R9B en el banco de datos (ID: 84687) se localiza en el cromosoma 17, 17q21.33, y consta de 10 exones. Codifica para una proteína que consta de un dominio de unión a F-actina, un sitio de unión a PP1c, un dominio PDZ a través del cual interactúa con diferentes proteínas transmembrana y un dominio en espiral en el extremo C-terminal (**Fig. 8**). Esta estructura sugiere que la espinofilina funciona como una proteína de andamiaje que regula las funciones de la membrana y el citoesqueleto. En el sistema nervioso, participa en la morfología y la regulación de la densidad de las espinas dendríticas, la plasticidad sináptica y la migración neuronal (Sarrouilhe et al., 2006). Está estrechamente asociada con las densidades postsinápticas de las sinapsis excitatorias (Muly et al., 2004), donde PP1 regula receptores de glutamato metabotrópicos, AMPA y NMDA (Ouimet et al., 2004). Además, se ha demostrado que estabiliza la expresión de receptores adrenérgicos en la superficie celular (Brady et al., 2003) y que interactúa con receptores dopaminérgicos D2 para permitir la unión de estos a moléculas de señalización y al citoesqueleto de actina (Sarrouilhe et al., 2006; F. D. Smith et al., 1999).

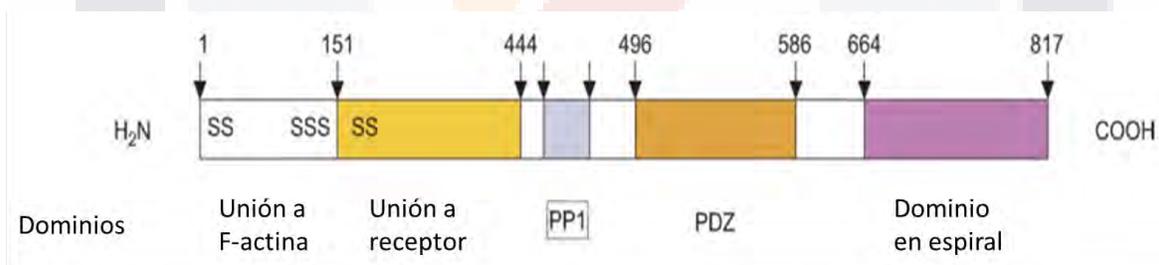


Fig. 8. Representación esquemática de los dominios que integran la estructura de la espinofilina (Tomado de Sarrouilhe et al., 2006). La estructura de la espinofilina incluye regiones para unión a F-actina, receptores, la fosfatasa PP1, un dominio PDZ y un dominio en espiral, esenciales para su papel en la organización del citoesqueleto y la señalización sináptica.

La espinofilina está presente en la mayoría de las espinas dendríticas, pero su concentración varía entre regiones cerebrales. Se encuentra enriquecida en la gran mayoría de las espinas dendríticas de la corteza cerebral, el caudatoputamen, la formación hipocampal y el cerebelo (Ouimet et al., 2004). En ratones knock out de espinofilina se ha demostrado que el tamaño general del cerebro se reduce, afectando particularmente al hipocampo, donde se reduce significativamente el

espesor de varias capas hipocampales como la capa molecular del GD, el estrato radiatum y el estrato lacunosum molecular. Asimismo, los estudios electrofisiológicos demostraron una disminución de LTD en el hipocampo de estos ratones, de modo que la espinofilina parece ser crucial para ciertas formas de plasticidad sináptica (Feng et al., 2000).

La expresión de espinofilina es baja durante el desarrollo en ratones, pero aumenta fuertemente después del nacimiento y persiste en el cerebro adulto (M. Tsukada et al., 2003). En un modelo de parkinsonismo en rata inducido por la lesión de la sustancia negra con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), los niveles de espinofilina disminuyeron durante el envejecimiento normal, fenómeno que se ha asociado con la progresión de la enfermedad de Parkinson (Brown et al., 2005). Asimismo, estudios en ratas Wistar envejecidas que tuvieron bajo rendimiento en el laberinto acuático de Morris han demostrado menores niveles de espinofilina en conjunto con otras proteínas implicadas en la plasticidad sináptica como la proteína 3 relacionada con la actina (ARP3), identificándolas como posibles correlatos moleculares del deterioro de la memoria asociado con la edad (Ottis et al., 2013).

2.4.3 MAP2

MAP2 es una proteína asociada a microtúbulos (MAP) que se expresa principalmente en las dendritas de las neuronas de los mamíferos (Harada et al., 2002), aunque también se ha detectado en células no neuronales como los oligodendrocitos y astrocitos (Papasozomenos Ch. & Binder, 1986; Vouyiouklis & Brophy, 1995). Esta proteína se caracteriza por su capacidad de estabilizar y aumentar la rigidez de los microtúbulos. Además, se ha demostrado que puede unirse a F-actina, por lo que se cree es esencial para procesos neuromorfogénicos, como la iniciación de neuritas, durante la cual las redes de microtúbulos y la F-actina se reorganizan de forma coordinada (Dehmelt & Halpain, 2005). De hecho, la sobreexpresión heteróloga de MAP2, especialmente MAP2c, en varios tipos de células resulta consistentemente en la formación de protuberancias similares a neuritas (DeGiosio et al., 2023).

La proteína MAP2 (**Fig.9**) tiene repeticiones de unión a microtúbulos cerca del extremo carboxilo terminal, cada una con un motivo KXGS conservado que puede ser fosforilado. Además, contiene un dominio de proyección amino-terminal de tamaño variable. Al igual que otras proteínas de su clase, carece de una estructura tridimensional fija en estado basal y se ha propuesto que adquiere conformaciones específicas al interactuar con sus dianas (microtúbulos, la F-actina y posiblemente

otras moléculas). No obstante, se ha identificado un dominio amino-terminal (residuos 86–103) que parece adoptar una estructura secundaria conservada, el cual interactúa funcionalmente con la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA). Tiene varias isoformas, con variación en la longitud del dominio de proyección y el número de repeticiones de unión a microtúbulos. Las formas principales de MAP2 son MAP2c, que es relativamente corta, y MAP2a y MAP2b, que tienen dominios de proyección más largos (Dehmelt & Halpain, 2005).

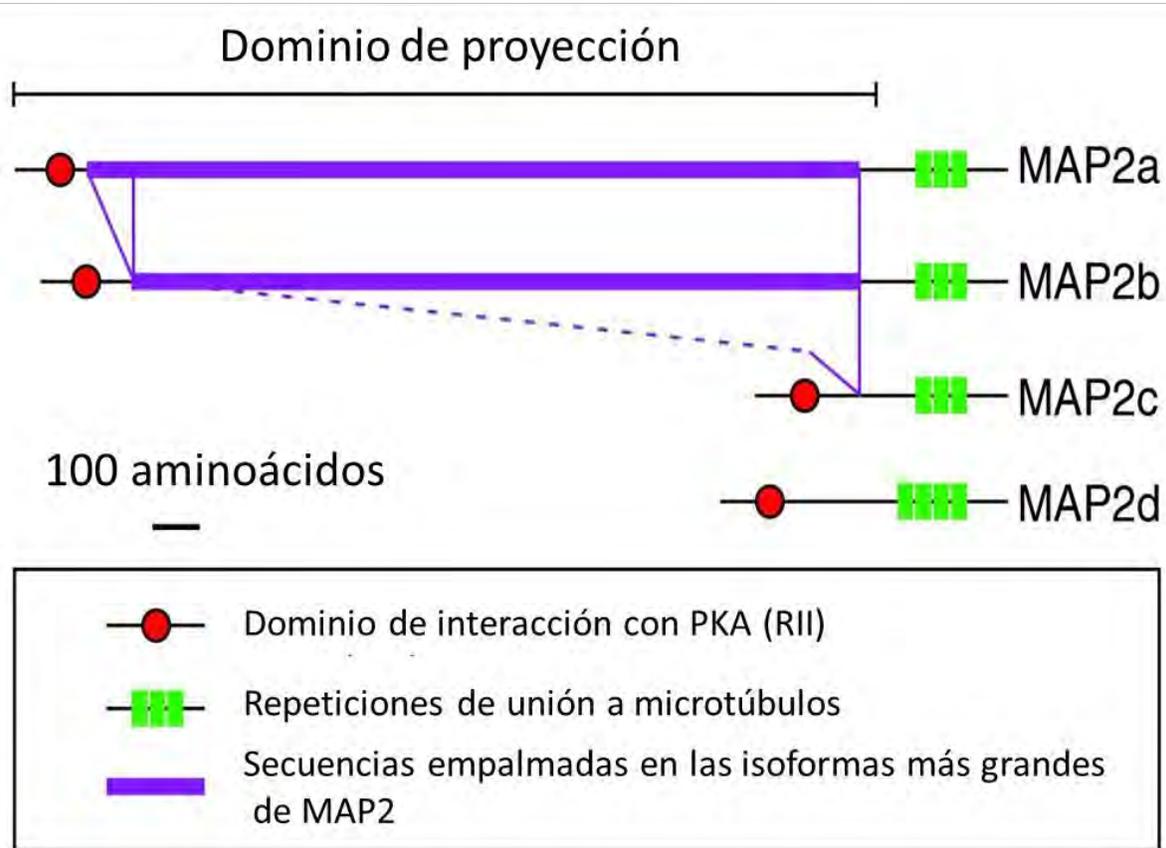


Fig. 9. Representación esquemática de los dominios que integran la estructura de las isoformas de MAP2 (Tomado de Dehmelt y Halpain, 2005). Se presentan formas de empalme alternativo con un número variable de repeticiones de unión a microtúbulos carboxiterminales y dominios de proyección aminotermiales de longitud variable. PKA (R11) indica un dominio que interactúa con la subunidad R11 de la proteína quinasa A.

Es codificada por un solo gen presente en el cromosoma 2 que contiene 20 exones, los cuales generan estas isoformas mediante un proceso de empalme alternativo del pre-ARNm (Sánchez et al., 2000). Las isoformas se agrupan según su peso molecular en dos grandes clases: las de alto peso molecular (MAP2a y MAP2b) y las de bajo peso molecular (MAP2c y MAP2d). La expresión de estas variantes está regulada de manera dependiente del desarrollo. MAP2a se encuentra

principalmente en el cerebro adulto, mientras que MAP2b se expresa durante todo el desarrollo del sistema nervioso. Por su parte, MAP2c predomina en etapas tempranas del desarrollo, aunque también se mantiene en estructuras del sistema nervioso adulto como la retina y el bulbo olfatorio, donde la neurogénesis persiste (Laurine et al., 2003). Las MAP2 de alto peso molecular están presentes principalmente en los cuerpos celulares de las neuronas y en las dendritas, aunque también se han encontrado presentes en las espinas dendríticas y en las densidades postsinápticas, por su parte las MAP2 de bajo peso molecular están ampliamente distribuidas en todos los compartimentos neuronales (Sánchez et al., 2000).

Se ha demostrado que el silenciamiento específico de MAP2 de alto peso molecular *in vivo* elimina la inducción de LTP en la vía colateral de Schaffer de las neuronas piramidales CA1 y bloquea el agrandamiento de las espinas dendríticas *in vitro*. Así mismo, en neuronas hipocámpales maduras se ha observado que el MAP2 en los ejes dendríticos se transloca a las espinas dendríticas y las agranda cuando se induce LTP. Estos hallazgos demuestran que MAP2 participa en la plasticidad sináptica dependiente de la actividad en las redes hipocámpales maduras (Kim et al., 2020). Por otro lado, se ha encontrado que MAP2 disminuye en un 93% en el hipocampo con el envejecimiento, lo cual podría estar asociado con el deterioro de las funciones de memoria relacionados con la edad. Asimismo, se ha sugerido que puede considerarse un marcador del deterioro de la estabilidad y plasticidad dendríticas relacionado con la edad (Di Stefano et al., 2001).

2.5 HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINA HIPOTALÁMICA (GnRH)

La GnRH, producida por neuronas hipotalámicas, es un decapeptido que desempeña un papel fundamental en la regulación de la función reproductiva. Su acción se ejerce a través del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HPG), al controlar la síntesis y liberación de gonadotropinas por la hipófisis anterior, que a su vez estimulan la producción de esteroides sexuales a partir de las gónadas (Maggi, 2016) (**Fig.10**). Las gonadotropinas pertenecen a la familia de las hormonas glicoproteicas y estimulan la espermatogénesis, la foliculogénesis y la ovulación (Naor, 2009)

Se han identificado más de 20 isoformas de GnRH en algunas especies de vertebrados, de las cuales GnRH I y II están presentes en humanos (Millar, 2005). La GnRH I (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) fue la primera

isoforma de GnRH descubierta en el cerebro de los mamíferos. En seres humanos, el gen GnRH I consta de cuatro exones y tres intrones, y reside en el brazo corto del cromosoma 8. GnRH I regula el eje hipotálamo-hipofisario y la secreción de gonadotropinas. La GnRH II (pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂), originalmente aislada del pollo, se encuentra altamente conservada en un amplio rango de especies vertebradas, desde peces con mandíbulas hasta humanos y tiene una amplia distribución en el cerebro, en particular en el rombencéfalo y la médula espinal (Naor, 2009). En la mayoría de las especies de vertebrados están presentes al menos dos, y normalmente tres, formas de GnRH (Millar et al., 2004).

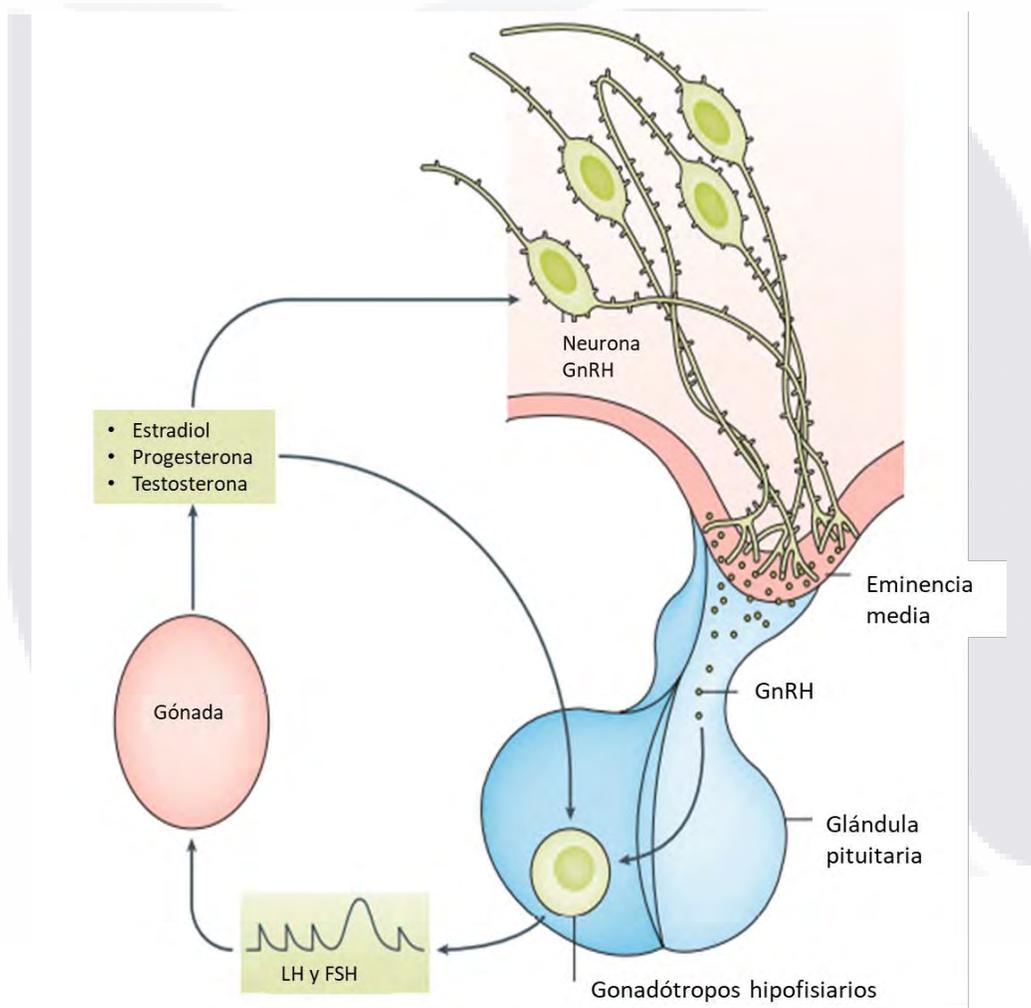


Fig. 10. Eje hipotálamo-pituitario-gonadal (Tomado de Herbison, 2016). Las neuronas que producen GnRH extienden largas dendritas hasta la eminencia media del hipotálamo, donde liberan GnRH en pequeños pulsos hacia la hipófisis anterior. Allí, esta hormona regula la secreción pulsátil de LH y FSH, esenciales para la función gonadal. Estas neuronas reciben múltiples señales sinápticas en su trayecto, y la actividad del sistema está modulada por retroalimentación de las hormonas sexuales.

La liberación de GnRH está regulada bajo la acción de diferentes neurotransmisores y neuropéptidos, y su secreción pulsátil impulsa los principales eventos de la vida reproductiva femenina, como el inicio de la pubertad y la regulación de los ciclos ováricos normales. En los varones, la GnRH también desempeña un papel esencial al estimular la secreción de hormona luteinizante (LH) y hormona folículoestimulante (FSH) desde la hipófisis anterior, lo que regula la espermatogénesis y la producción de testosterona por las células de Leydig en los testículos (Herbison, 2016). Así pues, la GnRH se libera en pulsos sincronizados desde las terminaciones nerviosas hacia el sistema portal hipofisiario cada 30 a 120 minutos para estimular la biosíntesis y secreción de LH y FSH por parte de los gonadótropos hipofisarios, donde se une a su receptor transmembranal (Maggi et al., 2016). Se ha propuesto que la frecuencia de los pulsos de GnRH determina diferencialmente la síntesis de LH y FSH. Las frecuencias altas de pulsos favorecen la expresión de la subunidad común α y, en menor medida, de la subunidad β de LH, mientras que frecuencias bajas aumentan selectivamente los niveles de ARNm de FSH β . Este patrón rítmico permite ajustar la secreción hormonal a las distintas fases del ciclo reproductivo (Naor, 2009). La interrupción o alteración en este patrón pulsátil tiene consecuencias importantes sobre la función reproductiva. Por ejemplo, una secreción continua o excesivamente lenta de GnRH puede suprimir la liberación de gonadotropinas, provocando disfunciones como la amenorrea hipotalámica funcional, anovulación o infertilidad (Herbison, 2016).

El receptor GnRHR se ubica en la pituitaria anterior y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), caracterizados por tener siete dominios transmembranales (Millar & Newton, 2010). Dado que la GnRH es una hormona peptídica, sus receptores se encuentran en la membrana plasmática de las células blanco. Al unirse a GnRH, el receptor sufre un cambio conformacional que activa vías intracelulares, modulando la expresión génica mediante cascadas de fosforilación (Bliss et al., 2010). Al activarse, el GnRHR se acopla principalmente a la proteína Gq, que promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ estimula la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C (PKC), la cual participa en la activación de la vía de las MAP quinasas, incluyendo ERK, a través de RAF-1 y MEK. La ERK fosforilada estimula factores de transcripción mediante la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), lo que promueve la transcripción de genes de subunidades de gonadotropinas y la posterior síntesis y liberación de LH y FSH (Karges et al., 2003) (**Fig. 11**). Estas gonadotropinas regulan posteriormente la producción de esteroides sexuales y la gametogénesis en las gónadas (Naor, 2009).

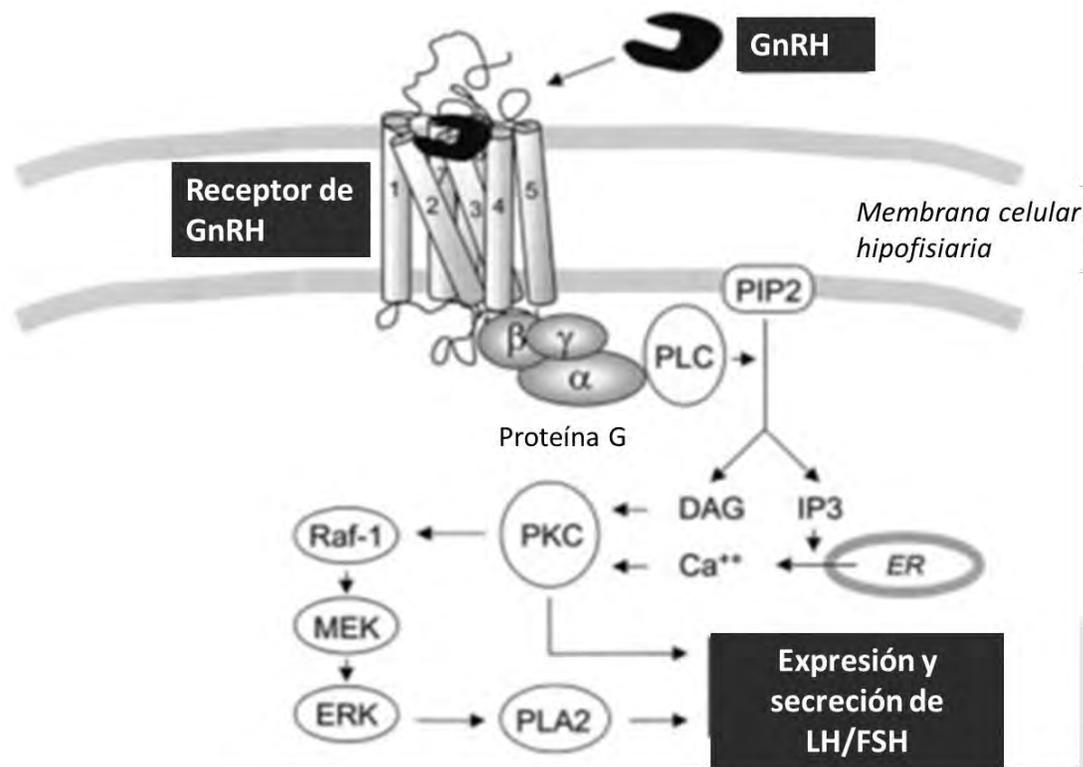


Fig. 11. Activación del Receptor de GnRH (Tomado de Karges et al., 2003). Se ilustran esquemáticamente las siete hélices transmembranales del receptor de GnRH así como la transducción de señales que conducen a la expresión génica y secreción de LH y FSH.

El receptor de GnRH (GnRHR) no solo se encuentra en la hipófisis anterior, sino que también se expresa en los tejidos reproductores femeninos, donde desempeña funciones autocrinas y paracrinas en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. En el endometrio normal, el sistema GnRH/GnRHR participa en procesos clave para la implantación embrionaria y la invasión del trofoblasto. En el ovario, regula el desarrollo folicular y la función del cuerpo lúteo. En el ámbito clínico, los análogos de GnRH se utilizan principalmente para suprimir la secreción ovárica de estrógenos en enfermedades ginecológicas como la endometriosis. No obstante, se ha evidenciado que los receptores de GnRH expresados localmente poseen efectos antiproliferativos relevantes (Limonta et al., 2012). Además, este receptor se ha identificado en neuronas de la corteza cerebral, la médula espinal, la vejiga y otros tejidos extra-hipofisarios (Bahk et al., 2008; Quintanar et al., 2007, 2009), incluido el hipocampo (Leblanc, Crumeyrolle, Latouche, Jordan, Fillion, L'Heritier, Kordon, Dussailant, Rostène, et al., 1988), donde la GnRH puede actuar para controlar múltiples funciones superiores, como el aprendizaje, la memoria y la conducta alimentaria (Wang et al., 2010).

2.5.1 EFECTOS DE LA GnRH EN MEMORIA Y APRENDIZAJE

Diferentes estudios han demostrado que la GnRH posee propiedades neurotróficas no relacionadas al proceso reproductivo, como incrementos en el desarrollo y número de neuritas, e incrementos en la expresión de neurofilamentos de neuronas en cultivo (Quintanar & Salinas, 2008). Así mismo, recientemente se ha demostrado que la terapia pulsátil con GnRH mejora la cognición y la conectividad cerebral en pacientes adultos con síndrome de Down (Manfredi-Lozano et al., 2022).

Algunos estudios han reportado que la expresión génica hipotalámica de GnRH disminuye en modelos de envejecimiento en roedores, lo cual se ha asociado a la disminución en la secreción de gonadotropina y el declive de la función reproductiva (Gruenewald et al., 2000). Cabe destacar que, a pesar de esta disminución, estudios han demostrado que la administración crónica de GnRH puede mejorar el rendimiento cognitivo en ratas envejecidas gonadectomizadas. Esta mejora se ha evidenciado mediante pruebas conductuales como la prueba de reconocimiento de objetos, el laberinto en T elevado y la prueba de evitación activa (González-Torres et al., 2019).

Se ha reportado una alta concentración de receptores de GnRH en el hipocampo (Leblanc, Crumeyrolle, Latouche, Jordan, Fillion, L'Heritier, Kordon, Dussaillant, Rostène, et al., 1988). Entre las funciones atribuidas a la GnRH en esta región cerebral se encuentran los efectos dependientes de la dosis sobre la densidad de espinas dendríticas. A concentraciones bajas, la GnRH incrementa tanto la densidad de espinas como la inmunoreactividad de espinofilina, mientras que a concentraciones más elevadas ambos parámetros se reducen (Prange-Kiel et al., 2008). Además, se ha reportado que la activación de los receptores de GnRH puede inducir una potenciación duradera de la transmisión sináptica, mediada por receptores ionotrópicos de glutamato en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en cortes de cerebro de rata y que la GnRH incrementa la excitabilidad neuronal intrínseca en las neuronas piramidales tanto de las regiones CA1 como CA3 del hipocampo (Wang et al., 2010).

Dado que el hipocampo es una estructura ampliamente reconocida por su papel fundamental en la memoria y el aprendizaje, consideramos que estos hallazgos podrían ser especialmente relevantes en estudios sobre el envejecimiento, etapa en la que dichas funciones se ven comprometidas. Por ello, resulta necesario profundizar en la exploración de los efectos de la GnRH y sus análogos en esta región cerebral.

2.6 ANÁLOGOS DE LA GnRH

Existen análogos sintéticos tanto agonistas como antagonistas de la GnRH, los cuales presentan una mayor potencia y duración de acción en comparación con la hormona endógena (Conn & Crowley, 1994). La principal modificación que tienen dichos análogos en su estructura química es una sustitución del aminoácido glicina en la secuencia original de la GnRH y la adición de etilamida en la posición terminal (Tabla 2).

Tabla 2. Análogos de la GnRH (De acuerdo a Conn y Crowley, 1994)

Nombre	Secuencia de Aminoácidos
GnRH	pyroGlu – His – Trp – Ser – Tyr – Gly – Leu – Arg – Pro – Gly - NH ₂
Decapeptil	d-Trp
Leuprolida	d-Leu -EtNH ₂
Buserelina	d-Ser (tBu) -EtNH ₂
Nafarelina	d-Nal (2) -EtNH ₂
Deslorelina	d-Trp -EtNH ₂
Histrelina	d-His (ImBzl) -EtNH ₂
Goserelina	d-Ser (Bu) -NH ₂

Con respecto a los efectos de la GnRH y sus análogos sobre el sistema nervioso SNC, se ha acumulado evidencia de su papel en la modulación de alteraciones en la actividad neurofisiológica. Por ejemplo, estudios epidemiológicos han mostrado una menor incidencia de EA en pacientes con cáncer de próstata tratados con agonistas de GnRH, lo que sugiere un efecto neuroprotector potencial de esta terapia (Meethal et al., 2005). Así, la exploración de las acciones extra-reproductivas de los agonistas de la GnRH podría abrir nuevas vías terapéuticas para trastornos complejos que comprometen múltiples funciones del sistema nervioso central y periférico.

2.6.1 ACETATO DE LEUPROLIDA

El acetato de leuprolida (AL) es un agonista sintético de GnRH que es menos susceptible a la proteólisis y tiene una mayor afinidad de unión a los receptores de GnRH que la hormona natural, lo que aumenta su actividad biológica. La GnRH endógena es un decapeptido con terminales amino y carboxilo bloqueadas que surgen de la escisión de un polipéptido precursor de 92 aminoácidos, mientras que el AL consiste en una modificación estructural de la molécula, que contiene un reemplazo de la glicina en la posición 6 por un residuo D-leucina hidrófobo y un

reemplazo de N-etilamida que sustituye a la glicinamida en la posición 10 (**Fig.12**). Dicho reemplazo, hace que la molécula análoga de GnRH sea resistente a la ecisión enzimática y aumenta en gran medida su unión a proteínas (46%), así como su vida media circulante: mientras que la GnRH posee una vida media corta de menos de 15 minutos, el AL tiene una vida media de 3.5 hrs. Así mismo, se ha establecido que el AL es de 80-100 veces más potente que la GnRH natural (Periti et al., 2002).

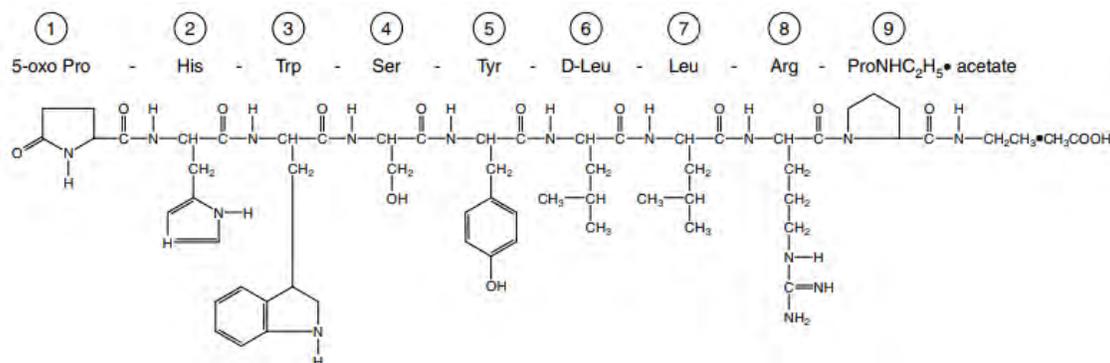


Fig. 12. Estructura química del acetato de leuprolida (Tomado de Periti et al., 2002). Representación estructural de un análogo sintético de la GnRH, que muestra las modificaciones clave en su secuencia peptídica —incluyendo el reemplazo de glicina por D-leucina en la posición 6 y la adición de un grupo N-etilamida en el extremo C-terminal— las cuales aumentan su estabilidad, vida media y afinidad por el receptor GnRHR.

El AL se usa para diversas aplicaciones clínicas, incluidos los trastornos del sistema reproductivo como el cáncer de próstata, la endometriosis, fibromas uterinos, pubertad precoz central y técnicas de fertilización *in vitro*, al suprimir la secreción gonadotrópica de LH y FSH que posteriormente suprime la producción de esteroides sexuales gonadales. Sin embargo, la presencia del receptor GnRHR en una multitud de tejidos no reproductivos, incluido el descubrimiento de la expresión de GnRHR en el hipocampo y la corteza del cerebro humano, indica que los análogos de la GnRH como el AL pueden actuar directamente a través de estos receptores para modular la función del cerebro (Wilson et al., 2007). Por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento con AL disminuye la gravedad de los signos clínicos relacionados con la locomoción de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental y también induce un aumento significativo de peso corporal junto con aumentos en la expresión de proteínas básicas de neurofilamentos y mielina, así como el diámetro axonal en la médula espinal (Guzmán-Soto et al., 2012). Además, otros trabajos han demostrado su papel potencial en la regeneración neuronal, siendo eficaz en la recuperación estructural y funcional de lesiones de la médula espinal (Díaz Galindo et al., 2015), mejorando la marcha, la velocidad de conducción nerviosa, la morfometría axónica y la expresión de MAP2 en ratas con transección completa del nervio ciático (Hernández-Jasso et al., 2020) y mejorando la actividad eléctrica así

como recuperando fibras del nervio óptico en un modelo de glaucoma (Esparza-Leal et al., 2022). Asimismo, se ha discutido su papel potencial como terapia adyuvante para la EA con inhibidores de la acetilcolina, ya que ha demostrado tener un efecto estabilizador sobre el funcionamiento cognitivo y global en mujeres con EA leve a moderada (LaPlante et al., 2006). Con base en estos estudios, creemos que el AL podría tener efectos similares de neuroregeneración en el hipocampo, lo que conduciría a una mejora en los procesos de memoria y aprendizaje dependientes del hipocampo, como la memoria espacial que se ven comprometidos durante el envejecimiento de los mamíferos.



3. JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas, que puede deberse tanto a déficits de memoria asociados con trastornos neurodegenerativos como a alteraciones cognitivas propias del envejecimiento normal. Estudios recientes han demostrado que la administración crónica de GnRH mejora el aprendizaje en ratas envejecidas gonadectomizadas. No obstante, se desconoce si el tratamiento con su análogo sintético, el acetato de leuprolida, ejerce efectos sobre el hipocampo y las funciones de memoria espacial dependientes de esta estructura. Por ello, el objetivo de este proyecto es explorar los efectos del acetato de leuprolida sobre la memoria espacial en ratas envejecidas, con la finalidad de identificar posibles alternativas terapéuticas que fortalezcan los mecanismos neuronales comprometidos durante la vejez. Aunque la disminución de la memoria espacial es un cambio cognitivo asociado con el envejecimiento que afecta a ambos sexos, gran parte de la investigación previa se ha realizado predominantemente en hembras. En este contexto, el presente estudio busca aportar nuevos datos obtenidos en ratas macho, con el propósito de enriquecer el conocimiento en este campo y de generar evidencia que pueda ser considerada en el desarrollo de estrategias terapéuticas futuras.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con acetato de leuprolida en ratas Wistar macho envejecidas mejorará el rendimiento de los animales en pruebas de memoria espacial. Además, atenuará las alteraciones en la plasticidad sináptica del hipocampo asociadas al envejecimiento.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Investigar los efectos del acetato de leuprolida en la memoria espacial de ratas envejecidas y en la plasticidad del hipocampo.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si existen diferencias en la locomoción de los animales que integran los grupos experimentales
2. Investigar los efectos del tratamiento con acetato de leuprolida en la memoria espacial de ratas envejecidas
 - a. A largo plazo con el laberinto acuático de Morris
 - b. A corto plazo con la prueba del laberinto en Y
3. Investigar los efectos del acetato de leuprolida en la plasticidad del hipocampo
 - a. Midiendo los niveles de expresión de espinofilina, MAP2 y NF-200
 - b. Evaluando cambios en la densidad neuronal:
 - i. En la capa de células piramidales del hipocampo
 - ii. En la capa de células granulares del giro dentado

6. MÉTODOS

6.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

En un primer protocolo se utilizaron 12 ratas Wistar macho de 24 meses de edad, las cuales fueron divididas en dos grupos experimentales: tratadas con acetato de leuprolida (envejecidas + AL, n=6) y tratadas con solución salina (envejecidas + SS, n=6).

Posteriormente, en otro protocolo se incluyó un grupo de ratas jóvenes intactas, para lo cual se utilizaron 12 ratas Wistar macho de 6 meses de edad, las cuales fueron evaluadas junto con otras 38 ratas Wistar macho de 24 meses de edad divididas en los grupos envejecidas + AL (n=23) y envejecidas + SS (n=15).

Los animales fueron alojados en grupos por jaula bajo un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas en una habitación con temperatura controlada (22 ° C) con alimentación Purina chow y agua de grifo *ad libitum*. Para ello, se emplearon jaulas domésticas diseñadas para contener hasta 10 ratas adultas, que cumplen con las especificaciones para evitar el hacinamiento (Directrices para el alojamiento de ratas en instituciones científicas: <http://www.animaethics.org.au>).

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con las Pautas de Cuidado Animal del NIH y fueron aprobados por el Comité de Ética para el Uso de Animales en la Docencia e Investigación de la UAA.

6.2 TRATAMIENTO

El grupo SS fue inyectado con 100 μ L solución salina (NaCl, 0.9%) y el grupo AL fue inyectado con 100 μ L de acetato de leuprolida (Sigma, St. Louis, MO, USA, 10 μ g/kg), un análogo sintético de la GnRH, por vía intramuscular una vez al día cada 3 días. En el primer protocolo experimental el tratamiento se realizó durante 5 semanas (Díaz et al., 2015, Altamira et al., 2019), mientras que en el segundo protocolo el tratamiento se realizó por 9 semanas en total. Para el grupo de ratas jóvenes del segundo protocolo, ningún tratamiento fue establecido.

6.3 PRUEBAS CONDUCTUALES

Protocolo 1: En el primer protocolo, las pruebas de comportamiento se realizaron en la última semana de tratamiento (semana 5, días 28-35), comenzando por la prueba de campo abierto, seguida por el laberinto acuático de Morris, para explorar los efectos del tratamiento con AL en la memoria espacial de ratas envejecidas (**Fig. 13**). Un día después de las pruebas conductuales se realizó el sacrificio de los animales, donde fueron obtenidas muestras de hipocampo con las que se realizaron pruebas moleculares.

• PROTOCOLO 1:

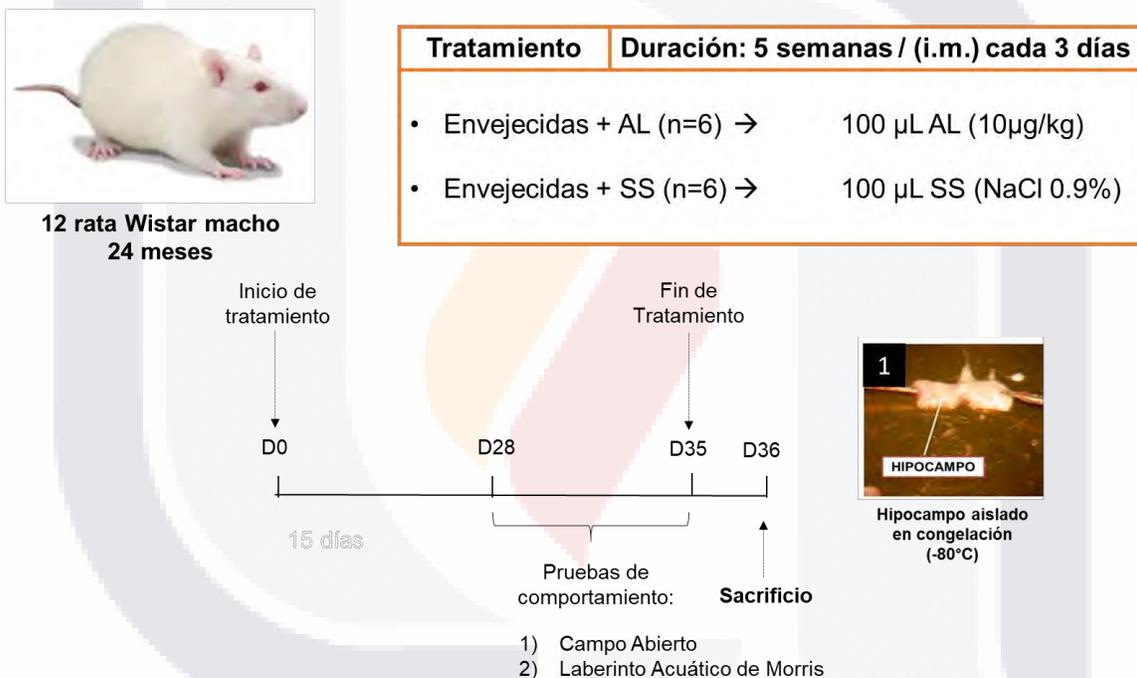


Fig. 13. Esquema general de trabajo para el protocolo 1. Representación esquemática de los días de tratamiento para el protocolo 1 que duró en total 5 semanas, así como los días de realización de pruebas conductuales (semana 5: días 28-35) y del sacrificio de los animales (día 36) con el que se obtuvieron muestras de hipocampo (1) para realizar pruebas moleculares preliminares.

Protocolo 2: En un segundo protocolo con un nuevo set de animales se aumentaron las semanas de tratamiento a 9 en total y se modificaron los tiempos de realización de las pruebas conductuales. La prueba de campo abierto se realizó en la semana 7 de tratamiento previo a las pruebas de memoria espacial. Posteriormente en las semanas 7, 8 y 9 de tratamiento se realizó el laberinto acuático de Morris, donde los animales fueron divididos en tres bloques con

representantes de cada grupo experimental: jóvenes (n=4), envejecidas + SS (n=5), envejecidas + AL (n=8), evaluando un bloque por semana. Al finalizar estas pruebas, en la semana 9 también se realizó la prueba de laberinto en Y para evaluar la memoria espacial a corto plazo en 2 de los animales de cada grupo experimental evaluados en cada bloque del laberinto acuático de Morris, completando una n=6 para cada grupo. Además, el día del sacrificio fueron obtenidas muestras de cada grupo experimental con las que se realizó la evaluación molecular e histológica en el hipocampo (**Fig.14**).

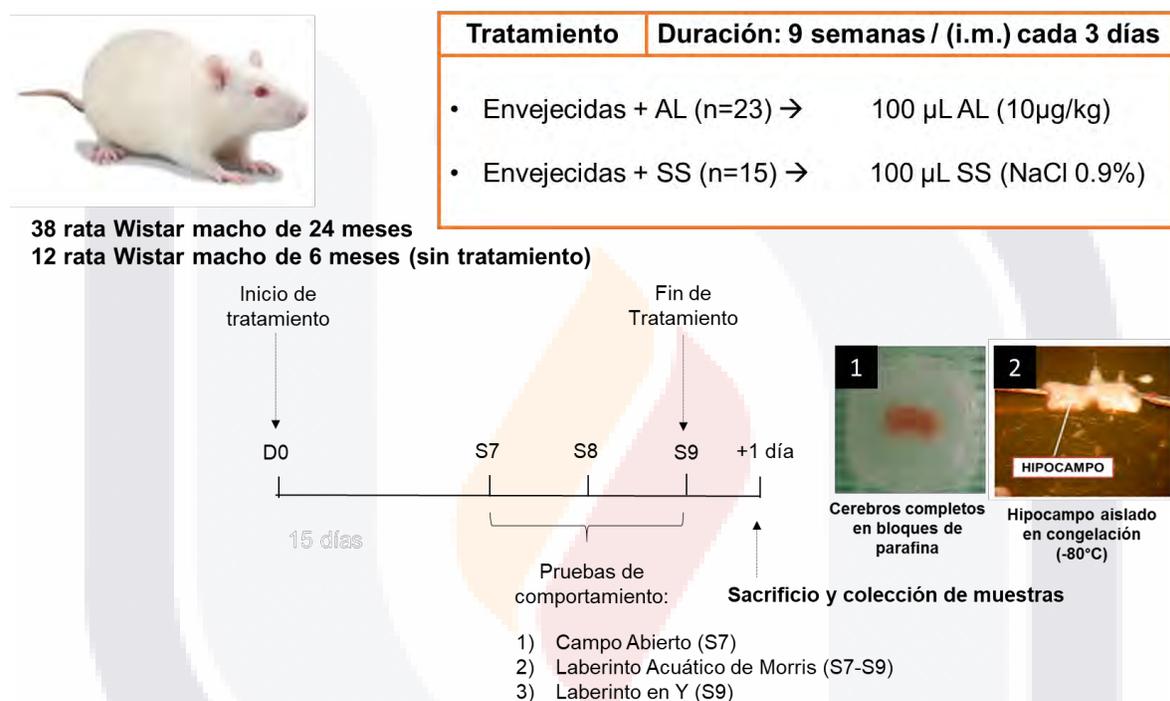


Fig. 14. Esquema general de trabajo para el protocolo 2. Representación esquemática de los días de tratamiento para el protocolo 2 que duró en total 9 semanas durante las que se realizaron en diferentes momentos las pruebas conductuales (semana 7: campo abierto, semana 7-9: tres bloques de laberinto acuático de Morris, semana 9: laberinto en Y). En este protocolo se incluyó un grupo de ratas jóvenes intactas, adicional a los grupos de ratas envejecidas + AL y envejecidas + SS. El sacrificio de los animales fue realizado el día posterior a las pruebas conductuales, donde se obtuvieron cerebros completos que posteriormente fueron incluidos en parafina para las pruebas histológicas (1), así como muestras de hipocampo (2) que fueron preservadas en congelación para realizar pruebas moleculares.

6.3.1 PRUEBA DE LOCOMOCIÓN: CAMPO ABIERTO

Con la finalidad de asegurar que los animales de los diferentes grupos experimentales no presentaran problemas en su locomoción que representaran

alguna desventaja para desempeñarse en las tareas de memoria espacial se realizó la prueba de campo abierto.

Para la evaluación se utilizó una cámara de prueba que fue monitoreada a través de un sistema de detección computarizado con sensores de haces de luz infrarroja (OmniTech Electronics, Inc) (**Fig. 15**). El aparato estuvo conformado por una arena (40 cm x 40 cm) rodeada por paredes de 40 cm de altura hechas de plástico transparente, integrado con un monitor de campo abierto que constó de 16 conjuntos de haces de luz en los ejes horizontal X y vertical Y. La cámara de prueba detectó los haces interrumpidos por el animal, lo que permitió al software determinar la ubicación del roedor dentro de la jaula.

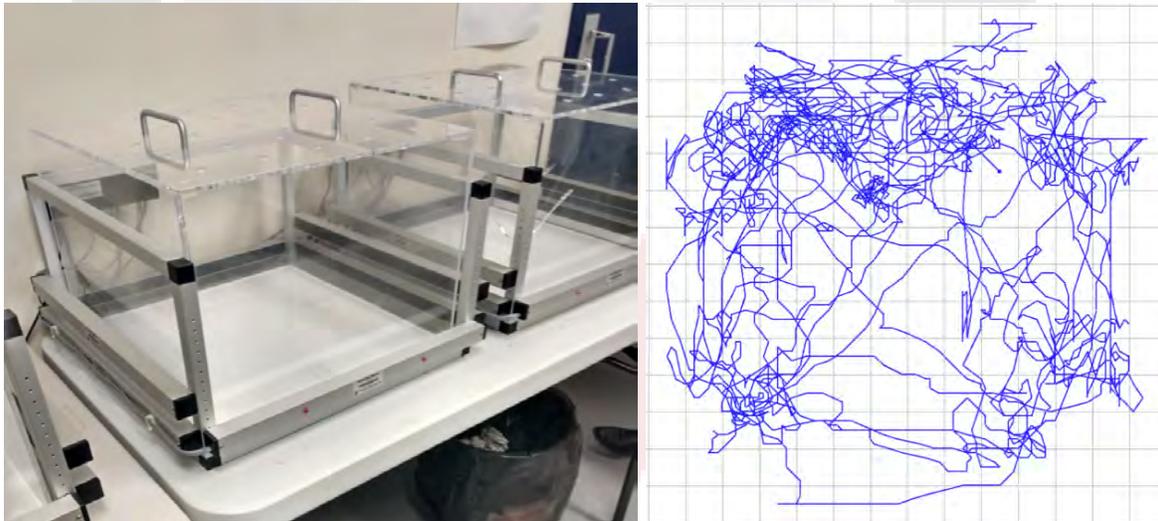


Fig. 15. Cámara utilizada para realizar la prueba de campo abierto. Se utilizó una cámara de prueba que fue monitoreada a través de un sistema de detección computarizado con sensores de haces de luz infrarroja (OmniTech Electronics, Inc) para monitorear el desplazamiento del animal.

La evaluación se realizó colocando cada rata en la zona central de la cámara de prueba y se le permitió explorar libremente y adaptarse al aparato durante 15 minutos en condiciones de iluminación ambiental estándar. Para analizar los datos, se registró el número de interrupciones del haz cada 5 minutos, lo cual permitió evaluar la actividad locomotora espontánea de los animales.

Se utilizó el software Fusion (versión 5.5; OmniTech Electronics, Inc; Ohio, EE. UU.) para calcular la distancia total recorrida por los animales y el tiempo transcurrido en actividad y en reposo.

6.3.2 PRUEBA DE MEMORIA ESPACIAL: LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

Para evaluar la memoria espacial en los diferentes grupos experimentales se realizó el laberinto acuático de Morris. La prueba se realizó en una piscina circular color azul de 170 cm de diámetro (San Diego Instruments, CA, EUA), llena de agua regulada a una temperatura de 25 °C. El agua del laberinto se vaciaba periódicamente para su limpieza y desinfección.

El laberinto se diseñó con dos ejes principales que lo dividían en cuatro cuadrantes iguales. El extremo de cada línea marcaba cuatro puntos cardinales: norte (N), sur (S), este (E) y oeste (O). Se colocó una plataforma de escape de 15 cm de diámetro en el centro de uno de los cuadrantes, sumergida 1.5 cm por debajo de la superficie del agua. Además, señales visuoespaciales fueron colocadas alrededor del laberinto respecto a cada uno de los cuadrantes (**Fig. 16**).

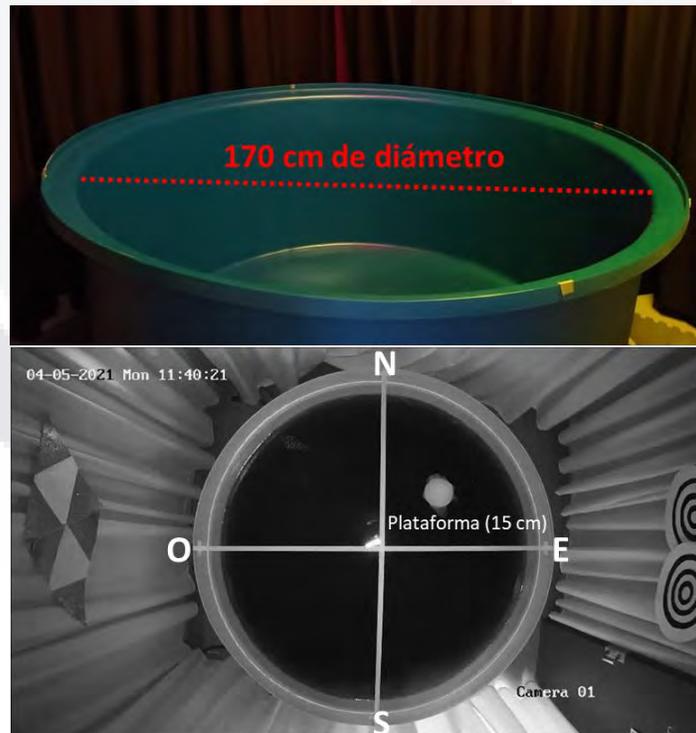
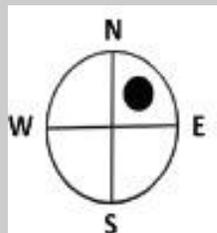


Fig. 16. Diseño del laberinto acuático de Morris. Se utilizó una piscina de 170cm de diámetro llena de agua regulada a una temperatura de 25 °C. El laberinto se dividió en cuadrantes y al centro de uno de ellos se colocó una plataforma de escape de 15 cm de diámetro, sumergida 1.5 cm por debajo de la superficie del agua. Alrededor fueron colocadas señales visuoespaciales.

La prueba consistió en dos fases: una primera fase de adquisición o entrenamiento y la fase de prueba. Durante la fase de entrenamiento, cada rata realizó cuatro ensayos diarios durante cuatro días consecutivos, con intervalos de descanso de 10 min entre cada ensayo. Los animales fueron colocados en el laberinto desde posiciones semialeatorias (**Tabla 3**), con el hocico orientado hacia las paredes de la piscina, con el objetivo de localizar una plataforma oculta situada en el cuadrante NE, cuya posición se mantuvo constante a lo largo de toda la fase de entrenamiento.

Tabla 3. Posiciones de salida de las ratas en la fase de entrenamiento del laberinto acuático de Morris

Día	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
1	NO	NE	SE	SO
2	NE	SO	SE	NO
3	SO	SE	NE	NO
4	SE	NO	NE	SO



Ubicación de la plataforma oculta: NE

Cada ensayo finalizó cuando la rata encontraba y se subía a la plataforma. Se registró el tiempo que tardaba en hacerlo (latencia de escape), lo que permitió construir la curva de aprendizaje para cada grupo experimental. Si la rata no encontraba la plataforma en un máximo de 60 segundos, se le guiaba suavemente hasta ella. Al final de cada ensayo, la rata permaneció en la plataforma durante 20 segundos, se secó y regresó a su jaula.

La fase de prueba se llevó a cabo al quinto día (**Fig. 17**), donde se evaluó la memoria espacial de las ratas en el laberinto sin plataforma durante 60 segundos en los cuales el comportamiento fue grabado en video. En todos los animales, la posición de salida el día de prueba fue en el cuadrante SO.



Fig. 17. Evaluación de la memoria espacial con el laberinto acuático de Morris. La prueba consistió en una fase de entrenamiento que duró cuatro días durante los que se realizaron 4 ensayos diarios para encontrar la plataforma oculta, seguida de la fase de prueba al día 5 donde se retiró la plataforma del laberinto y se registró la trayectoria de nado durante 60 segundos mediante un sistema de seguimiento automatizado.

Se registraron la trayectoria de nado, la latencia para entrar en el cuadrante objetivo (segundos), el tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo (segundos), la distancia recorrida en el cuadrante objetivo (cm), la distancia total de nado (cm) y la velocidad total de nado (cm/s) mediante un sistema de seguimiento automatizado (SMART versión 3.0, Panlab; Harvard Apparatus).

Se consideró que el animal tuvo un mejor desempeño en esta tarea cuando el día de prueba presentó menores tiempos de latencia de entrada al cuadrante donde estuvo ubicada la plataforma en los días de entrenamiento (NE) y cuando nadó más tiempo en este cuadrante.

6.3.3 PRUEBA DE MEMORIA ESPACIAL: LABERINTO EN Y

La memoria espacial a corto plazo se evaluó mediante la prueba de alternancia espontánea del laberinto en Y (Ijomone & Biose, 2019; Postu et al., 2019). Las dimensiones de los brazos del laberinto fueron de 35 cm de largo, 10 cm de ancho y 25 cm de alto, con un área central triangular equilátera. En cada brazo fueron colocadas señales visuoespaciales (Fig.18).

Esta prueba se realizó únicamente en las ratas del segundo protocolo, donde la alternancia espontánea se evaluó en una sola sesión dentro de la semana 9 de tratamiento, tras finalizar las evaluaciones del laberinto acuático de Morris de todos los animales.

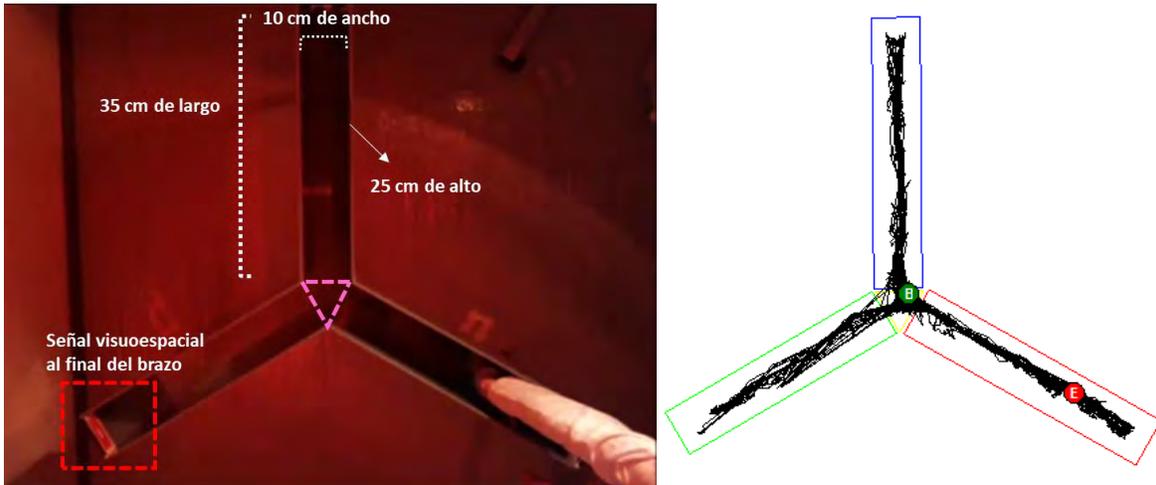


Fig. 18. Vista del laberinto en Y. Se muestran una fotografía del laberinto en Y que fue utilizado para la evaluación de la memoria espacial a corto plazo, registrando el desplazamiento de los animales durante la prueba. Las dimensiones de los brazos del laberinto fueron de 35 cm de largo, 10 cm de ancho y 25 cm de alto, con un área central triangular equilátera. En cada brazo fueron colocadas señales visuoespaciales (recuadro rojo).

Cada rata se colocó al final de un brazo del laberinto en Y simétrico con el hocico apuntando hacia las paredes de cada extremo. Las ratas tuvieron 10 minutos para explorar libremente el aparato, donde el comportamiento fue grabado en video. Los videos adquiridos fueron analizados con el software SMART (versión 3.0; Panlab, Harvard Apparatus), para rastrear el desplazamiento de cada animal.

La conducta de alternancia espontánea exitosa se produjo cuando las ratas ingresaron a los tres brazos del laberinto consecutivamente (formando tripletes) como se muestra en la **Fig. 19**. La entrada a cada brazo se consideró cuando la cabeza y las extremidades de la rata entraron completamente al mismo.

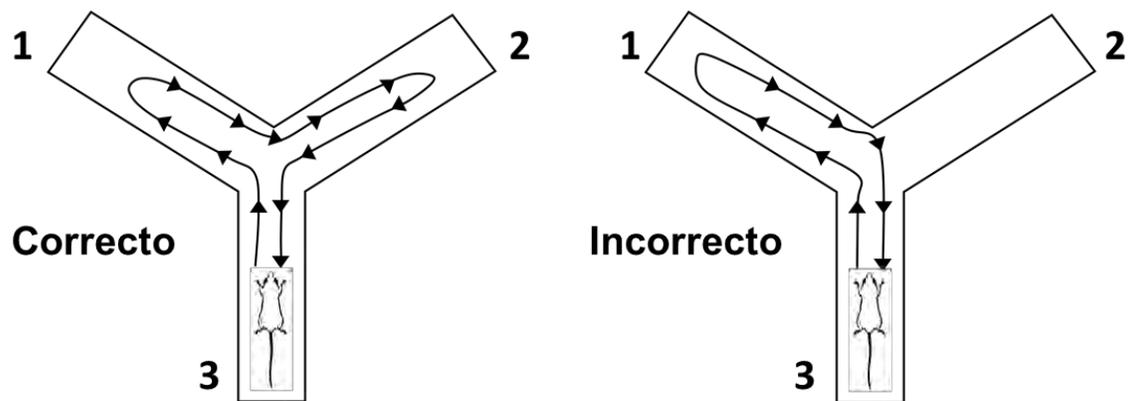


Fig. 19. Evaluación de alternancia espontánea en el laberinto en Y. Se muestran trayectorias representativas de una alternancia espontánea correcta e incorrecta.

El porcentaje de alternancia espontánea se calculó como $(\text{número de alternancias} / \text{entradas totales} - 2) \times 100$, y se obtuvo utilizando el sistema de seguimiento de video inteligente (SMART versión 3.0, Panlab; Harvard Apparatus). Se consideró que los animales se desempeñaban mejor en esta prueba cuando tenían mayores porcentajes de alternancia, ya que eran capaces de recordar el brazo donde habrían estado previamente.

6.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Al concluir todas las pruebas conductuales, las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de isoflurano, seguida de decapitación, con el fin de obtener muestras de hipocampo destinadas a los análisis moleculares que permitieron evaluar su plasticidad. Para cuantificar la expresión de las proteínas espinofilina, NF-200 y MAP2 en el hipocampo de los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se llevó a cabo un análisis de proteínas mediante la técnica de Western blot.

6.4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para el análisis semicuantitativo de proteínas, se disecó todo el hipocampo siguiendo el protocolo descrito previamente por Chiu *et al.*, 2007 (**Anexo 1**). Las muestras fueron rápidamente congeladas y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

Se utilizaron hipocampos de tres ratas distintas por cada grupo experimental (jóvenes, envejecidas + SS y envejecidas + AL), los cuales fueron homogeneizados en un buffer de lisis frío (20 mM Tris/HCl, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂) suplementado con Triton X-100 al 1% y un cóctel de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 0.6 mM aprotinina y 2 μM leupeptina). Posteriormente, el homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en el mismo buffer de lisis sin Triton X-100 y conservado a -80°C.

La concentración proteica para cada muestra fue estimada a través de un kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (Thermo Scientific, EE. UU.) con el que se preparó una curva estándar utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como referencia (**Fig. 20**). Se emplearon concentraciones conocidas de BSA (0, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 μg/ml), las cuales fueron procesadas en paralelo con las muestras experimentales. Al final, la absorbancia fue medida a 562 nm utilizando un espectrofotómetro. La curva estándar resultante se usó para interpolar la concentración de proteínas en las muestras a partir de sus valores de absorbancia. Todos los análisis se realizaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los datos.

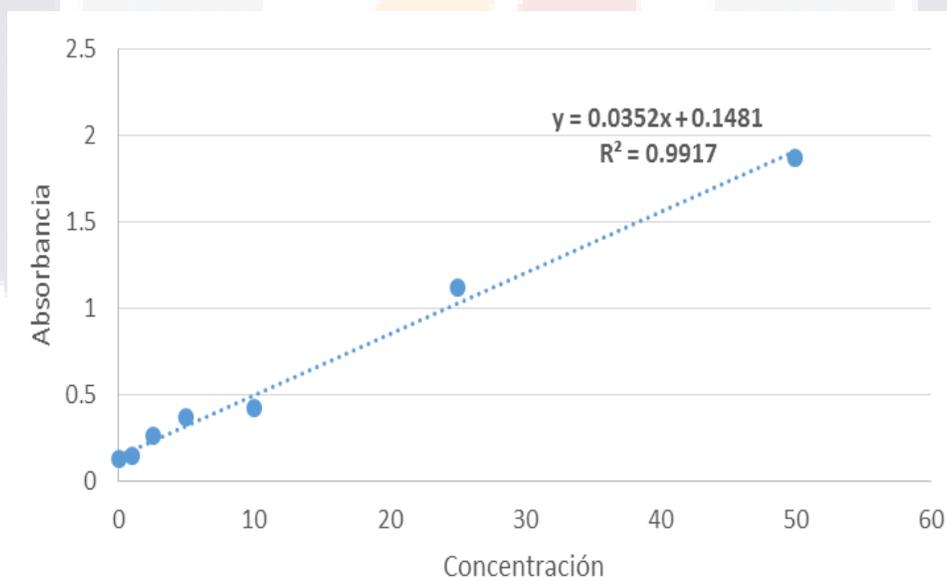


Fig. 20. Ejemplo de curva BSA para cuantificación de proteínas. Se muestra una curva BSA utilizada para interpolar la concentración de proteínas en las muestras a partir de sus valores de absorbancia. Un valor de $R^2 \geq 0.99$ fue considerado adecuado para garantizar la precisión y linealidad de la curva.

6.4.2 ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Alícuotas con una concentración de 25 µg de proteínas para cada muestra fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% en tampón Tris-Glicina a 80 V durante toda la noche. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Inmobilon-P Transfer Membranes, Merck Millipore) en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3) a 12 mA por toda la noche en cámara fría.

6.4.3 INMUNODETECCIÓN

Para la inmunodetección se bloquearon las membranas con leche en polvo sin grasa al 5% en solución salina tamponada con Tris (TBS) por 1 hr a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C, durante toda la noche con los anticuerpos primarios que se enlistan en la **Tabla 4**. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua destilada y tres veces con TBS-Tween20 (TBS-T) y los anticuerpos unidos se detectaron incubando durante 2 hrs con el anticuerpo secundario conjugado específico para cada caso.

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el análisis de proteínas mediante la técnica de Western blot.

Proteína	PM	Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Espinofilina	132 kDa	Anti-neurabin II (Espinofilina) de conejo (Abcam, #Ab18561)	1:1000	Anti-conejo (Zymed, #816120)	1:5000
MAP2	a/b: 280 kDa c/d: 70 kDa	Anti-MAP2 de ratón (Invitrogen, #13-1500)	1:500	Anti-ratón (Zymed, #816520)	1:5000
NF-200	200 kDa	Anti-NF200 de ratón (Sigma-Aldrich, #N0142)	1:1000	Anti-ratón (Zymed, #816520)	1:5000
GAPDH	37 kDa	Anti-GAPDH de conejo (Sigma-Aldrich, #G9545)	1:10,000	Anti-conejo (Zymed, #816120)	1:5000

Las bandas de proteína se visualizaron con el sustrato Clarity™ Western ECL (Bio-Rad) y se capturaron con un fotodocumentador (MicroChemi 4.2, Bio-Imaging Systems). Se empleó el software Biorad Image Lab 6.1 para medir la densidad de

las bandas de proteína. Los valores se presentan como la intensidad media relativa a GAPDH.

6.5 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Tras el sacrificio de los animales mediante sobredosis anestésica, se obtuvieron también cerebros completos con el fin de complementar los estudios de plasticidad mediante evaluaciones histológicas. Para ello, se realizó una perfusión transcardíaca con solución salina al 0.9%, seguida de formalina neutra al 10% para lograr una adecuada fijación del tejido. Posteriormente, los cerebros fueron aislados y sumergidos en formalina neutra al 10% para post-fijación durante dos semanas a temperatura ambiente. Una vez fijados, los cerebros se procesaron en un histoquinete automático para su inclusión en bloques de parafina. Los bloques obtenidos se conservaron refrigerados a 4 °C hasta su procesamiento para la obtención de cortes histológicos. Se realizaron cortes coronales de 3 µm de espesor que incluían el hipocampo dorsal en las coordenadas que se ilustran en la **Fig. 21** (Bregma -3.24 mm, Interaural 5.76 mm).

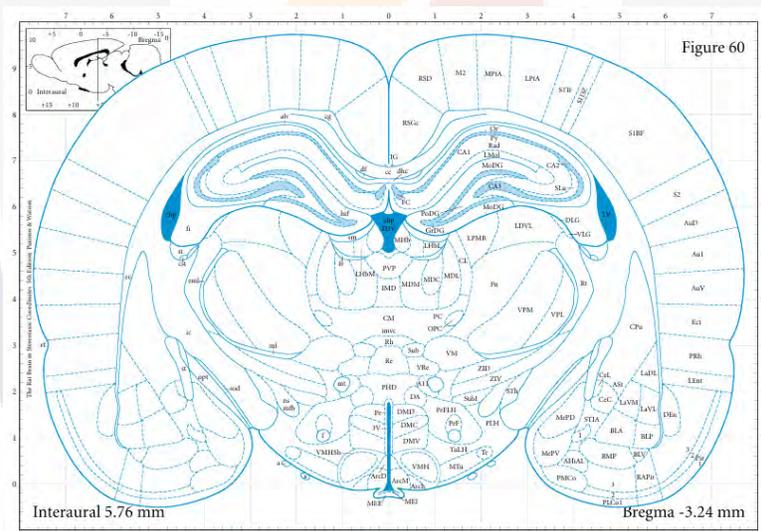


Fig. 21. Coordenadas de los cortes coronales del cerebro (Paxinos & Watson, 2005). Los cortes se realizaron a un bregma de -3.24 mm donde se observó el hipocampo dorsal con la capa de células piramidales (CA1, CA2, CA3) y granulares (GD) bien definidas.

Los cortes obtenidos se colocaron en un baño de flotación a 45 °C y se colectaron en laminillas. Las laminillas con los tejidos se llevaron a una estufa a 57 °C durante 24 horas para su desparafinización. Finalmente, los cortes se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina (H/E) y se montaron con Entellan para su posterior análisis.

6.5.1 EVALUACIÓN DE LA DENSIDAD NEURONAL

Para estudiar los cambios en la densidad neuronal en los grupos experimentales se tomaron fotografías de las laminillas teñidas con H/E a un aumento de 40x en campos que incluían el GD del hipocampo, así como CA1, CA2 y CA3 (**Anexo 2**), utilizando un microscopio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Alemania) equipado con cámara de video (MU1803) y software AmScope. La medición del grosor de la capa de células granulares del GD y de la capa de células piramidales en CA1, CA2 y CA3 se realizó en 5 campos aleatorios por región analizada en 3 cortes pertenecientes a 12 animales de cada grupo experimental utilizando el software ImageJ (Wayne Rasband NIH, Bethesda, MA, Estados Unidos). Para la medición se tomó en cuenta la altura de todos los núcleos que se observaron dentro de la zona aleatoria seleccionada. Adicionalmente, se realizó por fotografía un conteo manual del total de los núcleos celulares presentes en las regiones del hipocampo analizadas. Posteriormente, se calculó la relación núcleos/ μm dividiendo el número de núcleos contabilizados entre la longitud (μm), de la capa donde se efectuó el conteo (**Fig. 22**).

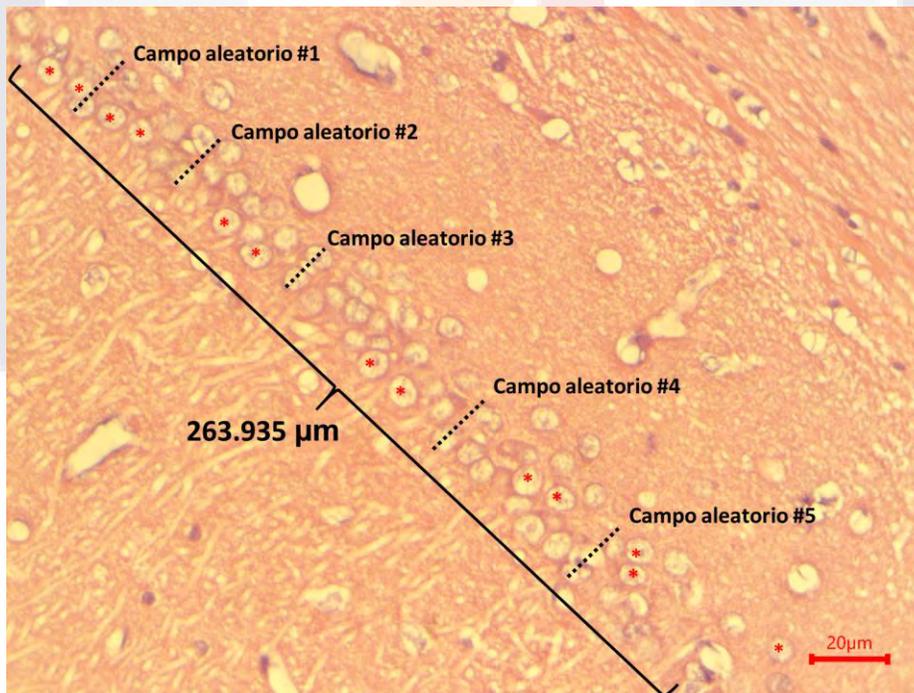


Fig. 22. Representación esquemática del análisis histológico. Se muestra una de las regiones del hipocampo incluidas en el análisis (CA1) donde se midió el grosor de la capa neuronal en 5 campos aleatorios como se muestra con líneas punteadas. Los asteriscos en rojo señalan algunos de los núcleos celulares que se contabilizaron a 40x en la capa de neuronas estudiada, los cuales se reportaron como núcleos/ μm de acuerdo a la longitud de la capa por fotografía (que en este caso fue de 263.935 μm).

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos en las pruebas conductuales, moleculares e histológicas se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.). El análisis estadístico para comparar diferencias entre el grupo joven y los grupos envejecidos con tratamiento se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para comparar los efectos entre los grupos.

Para los resultados del laberinto acuático de Morris y de expresión de proteínas en los animales del protocolo 1, donde sólo se compararon los grupos de ratas envejecidas tratadas con SS y AL, el análisis se hizo con una prueba t de Student para medidas no pareadas Asimismo, para el análisis estadístico de las curvas de aprendizaje obtenidas durante la fase de entrenamiento se empleó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías, seguido de la prueba de Tukey para hacer comparaciones entre los grupos por cada día de entrenamiento.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 CAMPO ABIERTO: EL ENVEJECIMIENTO Y EL TRATAMIENTO CON ACETATO DE LEUPROLIDA EN RATAS WISTAR MACHO NO AFECTAN LA LOCOMOCIÓN

Inicialmente, se realizó la prueba de campo abierto en los animales de los protocolos experimentales 1 (a las 5 semanas de tratamiento) y 2 (a la semana 7 de tratamiento), con el objetivo de evaluar posibles alteraciones en la locomoción que pudieran influir en el desempeño de las tareas conductuales para evaluar la memoria espacial. Esta evaluación fue particularmente relevante para la prueba del laberinto acuático de Morris, la cual implica una actividad de nado que puede verse afectada por el tratamiento o la edad de los animales. En caso de alteraciones locomotoras, estas podrían explicar las diferencias observadas entre los grupos experimentales.

En esta prueba se midió la distancia total recorrida (cm), el tiempo de actividad (s) y el tiempo de reposo (s). Los resultados obtenidos al comparar la distancia total recorrida a las 5 y 7 semanas de tratamiento revelaron que no existen diferencias significativas entre los grupos estudiados tras realizar el ANOVA de una vía ($F_{(4,57)} = 1.023$, $p=0.403$). Por su parte, la prueba de Tukey no mostró cambios estadísticamente significativos entre el grupo de ratas jóvenes (1469 ± 225.3 cm; $n=12$) y los grupos de ratas envejecidas tratados con SS o AL durante 5 (SS: 1844 ± 329.9 cm, $n=6$; AL: 1513 ± 213.9 cm, $n=6$) y 7 semanas (SS: 1680 ± 156.8 cm, $n=15$; AL: 1400 ± 69.63 cm, $n=23$) (Fig.23).

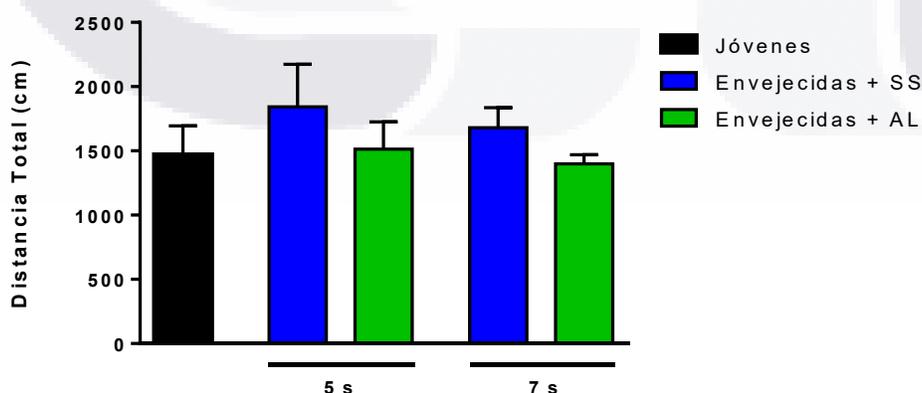


Fig. 23. Comparación de la distancia total recorrida (cm) en la prueba de campo abierto. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales tras 5 y 7 semanas de tratamiento con SS y AL. Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M.

De manera similar, la comparación del tiempo en actividad de los animales durante la prueba de campo abierto no mostró cambios significativos tras realizar el ANOVA de una vía ($F_{(4,57)} = 1.721$, $p=0.158$). Asimismo, con la prueba de Tukey no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de ratas jóvenes (475.7 ± 36.09 s; $n=12$) y los grupos de ratas envejecidas tratados con SS o AL durante 5 (SS: 418.6 ± 69.05 s, $n=6$; AL: 433.8 ± 23.81 s, $n=6$) y 7 semanas (SS: 515.3 ± 11.9 s, $n=15$; AL: 480.9 ± 12.98 s, $n=23$) (**Fig.24**).

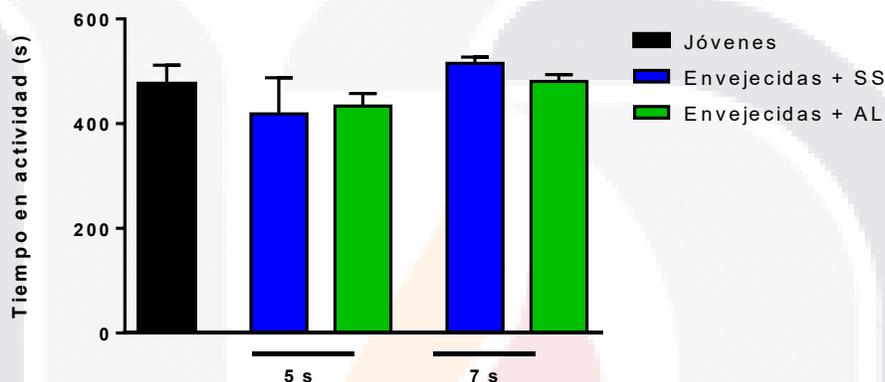


Fig. 24. Comparación del tiempo de actividad (s) en la prueba de campo abierto. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales tras 5 y 7 semanas de tratamiento con SS y AL. Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M.

Por su parte, el análisis del tiempo en reposo de los animales durante la prueba de campo abierto no reveló diferencias significativas entre los grupos, según el análisis de ANOVA de una vía ($F_{(4, 57)} = 0.4714$, $p = 0.7565$). El análisis post hoc de Tukey tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de ratas jóvenes (424.3 ± 36.09 s; $n = 12$) y los grupos de ratas envejecidas tratadas con SS o AL, tanto a las 5 semanas (SS: 411.6 ± 64.91 s, $n = 6$; AL: 416 ± 25.34 s, $n = 6$) como a las 7 semanas (SS: 384.5 ± 11.89 s, $n = 15$; AL: 419.1 ± 12.98 s, $n = 23$) de tratamiento (**Fig. 25**).

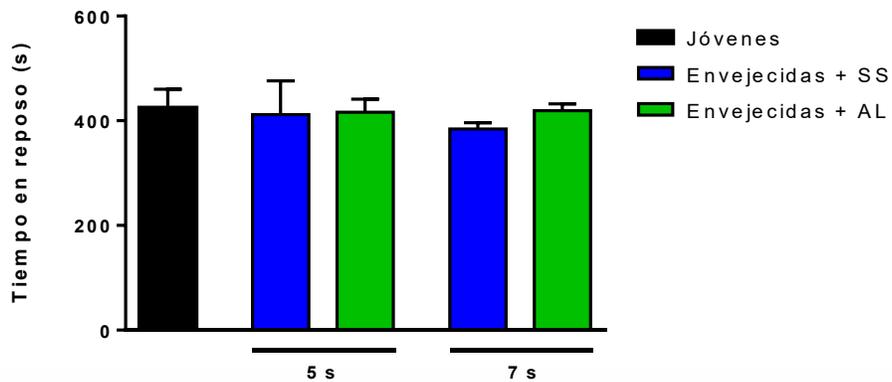


Fig. 25. Comparación del tiempo en reposo (s) durante la prueba de campo abierto. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales tras 5 y 7 semanas de tratamiento con SS y AL. Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M.

La suma de los resultados obtenidos mediante la prueba de campo abierto (**Tabla 5**) indican que no hubo diferencias significativas en el desempeño locomotor de los animales tras 5 y 7 semanas de tratamiento. Lo anterior sugiere que ni el envejecimiento ni la administración del fármaco AL afectaron la capacidad motora de los animales, por lo que es poco probable que diferencias en la locomoción de los grupos experimentales hayan influido en su rendimiento durante las pruebas de memoria espacial, como el laberinto acuático de Morris.

Tabla 5. Comparación de resultados en la prueba de campo abierto en los animales del protocolo 1 y 2

Parámetro evaluado	5 semanas de tratamiento			7 semanas de tratamiento		p
	Jóvenes	Envejecidas + SS	Envejecidas + AL	Envejecidas + SS	Envejecidas + AL	
Distancia total (cm)	1469 \pm 225.3 (n=12)	1844 \pm 329.9 (n=6)	1513 \pm 213.9 (n=6)	1680 \pm 156.8 (n=15)	1400 \pm 69.63 (n=23)	0.403
Tiempo en actividad (s)	475.7 \pm 36.09 (n=12)	418.6 \pm 69.05 (n=6)	433.8 \pm 23.81 (n=6)	515.3 \pm 11.9 (n=15)	480.9 \pm 12.98 (n=23)	0.158
Tiempo en reposo (s)	424.3 \pm 36.09 (n=12)	411.6 \pm 64.91 (n=6)	416 \pm 25.34 (n=6)	384.5 \pm 11.89 (n=15)	419.1 \pm 12.98 (n=23)	0.7565

7.2 PROTOCOLO 1: TRATAMIENTO POR 5 SEMANAS

7.2.1 CURVA DE APRENDIZAJE DURANTE LA FASE DE ENTRENAMIENTO DEL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

Para investigar los posibles efectos terapéuticos de la administración del AL, se evaluó la memoria espacial de los animales de estudio utilizando el laberinto acuático de Morris. A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante la fase de entrenamiento del protocolo 1, donde la prueba se realizó en la semana 5 de tratamiento únicamente en ratas envejecidas de los grupos tratados con SS y AL.

Durante la fase de adquisición, que incluyó cuatro sesiones de entrenamiento por día como se describe en los métodos, se observó que la latencia de escape para encontrar la plataforma disminuyó progresivamente en todos los grupos a medida que avanzaban los días de entrenamiento. El ANOVA de medidas repetidas de dos vías no reveló diferencias significativas en la interacción entre las variables ($F_{(3, 40)} = 0.192$, $p = 0.9012$) ni entre los grupos estudiados ($F_{(1, 40)} = 0.348$, $p = 0.5586$); sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre los días de entrenamiento ($F_{(3, 40)} = 13.07$, $p < 0.001$), lo que indica un efecto del tiempo en el aprendizaje de la tarea (**Fig. 26A**).

Asimismo, se calcularon las puntuaciones de los índices de aprendizaje obtenidos por cada grupo experimental. Este índice fue calculado obteniendo el promedio de las latencias de escape (s) que tuvo cada uno de los animales durante los cuatro días que duró la fase de adquisición. Los resultados, que se analizaron mediante una prueba t de Student para medidas no pareadas, no mostraron diferencias significativas ($p=0.6368$) entre el grupo de ratas envejecidas + SS (37.22 ± 2.971 s; $n=6$) y el grupo de ratas envejecidas +AL (35.25 ± 2.744 ; $n=6$) (**Fig. 26B**).

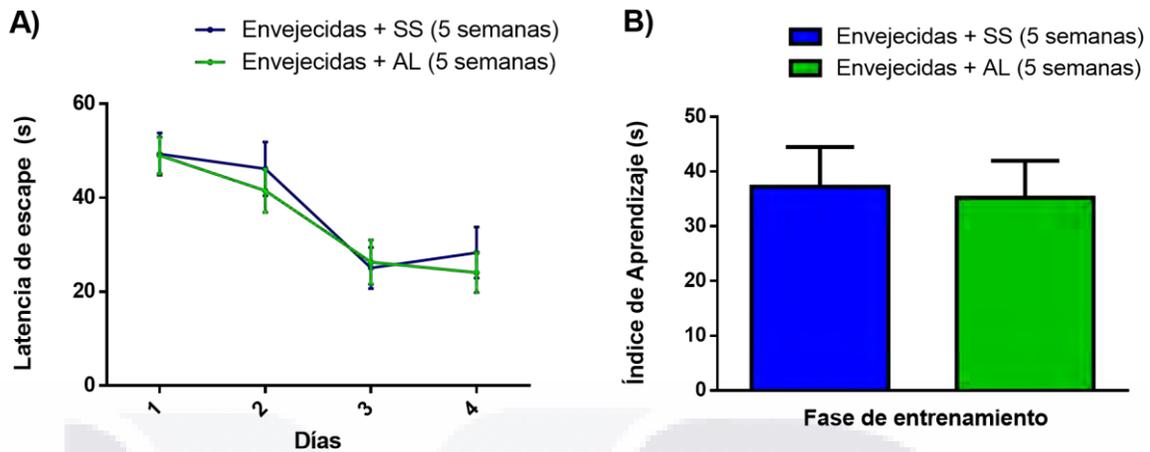


Fig. 26. Resultados del laberinto acuático de Morris durante la fase de adquisición o entrenamiento del protocolo 1. (A) Latencia de escape en segundos para cada uno de los cuatro días de entrenamiento. (B) Se muestra el índice de aprendizaje de cada grupo, que representa el promedio de las latencias de escape (s) por los cuatro días que duró la fase de adquisición. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M.

7.2.2 EL ACETATO DE LEUPROLIDA DISMINUYE EL TIEMPO DE LATENCIA EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS TRAS 5 SEMANAS DE TRATAMIENTO

La memoria espacial de los animales del protocolo 1 fue evaluada durante la fase de prueba, en la que se retiró la plataforma y se rastreó el recorrido de cada animal durante 60 segundos. Para esta evaluación se registraron cuatro parámetros: la latencia de entrada al cuadrante objetivo (s), el tiempo total en dicho cuadrante (s), el número de entradas al cuadrante objetivo (#) y la distancia recorrida dentro del cuadrante objetivo (cm).

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos únicamente en la latencia de entrada al cuadrante objetivo (**Fig. 27B, Tabla 6**). En particular, el grupo de ratas envejecidas tratadas con AL (5.198 ± 0.3923 s; $n=6$) presentó una latencia menor en comparación con el grupo tratado con solución salina (12.01 ± 2.294 s; $n=6$; $p<0.05$), lo que sugiere que el tratamiento con AL durante 5 semanas podría mejorar la memoria espacial en ratas macho envejecidas. Sin embargo, los demás parámetros evaluados (tiempo en el cuadrante objetivo, número total de entradas al cuadrante objetivo y distancia recorrida en el cuadrante objetivo) no mostraron diferencias significativas entre los grupos (**Fig. 27C-E, Tabla 6**). Por lo tanto, los resultados obtenidos a las 5 semanas de tratamiento no permiten concluir de manera definitiva sobre la efectividad del fármaco en esta etapa.

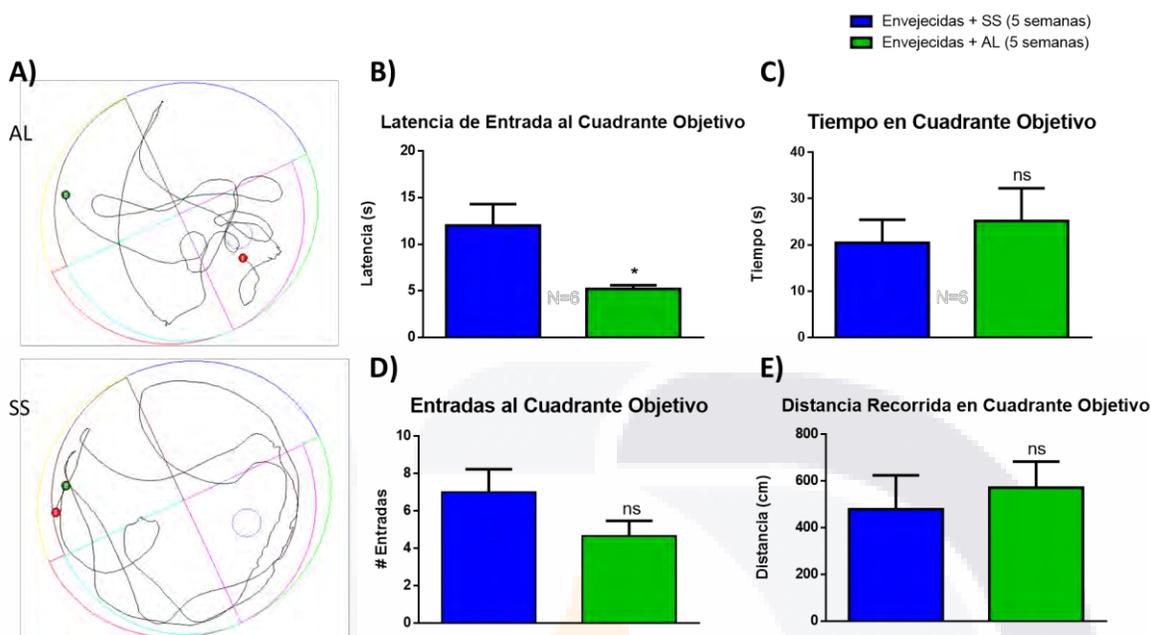


Fig. 27. Resultados de la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en el protocolo 1. (A) Trayectorias de búsqueda representativas para cada grupo. (B) Latencia de entrada al cuadrante objetivo (s), donde se aprecia que el grupo de ratas envejecidas y tratadas con AL tuvieron un mejor rendimiento en la prueba. (C) Tiempo en segundos en el cuadrante objetivo. (D) Número de entradas al cuadrante objetivo. (E) Distancia recorrida en cm en el cuadrante objetivo. En los parámetros medidos C-E no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se muestran como la media ± S.E.M; *p<0.05; n=6.

Tabla 6. Comparación de resultados estadísticos en la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en los animales del protocolo 1

Parámetro evaluado	5 semanas de tratamiento		p
	Envejecidas + SS	Envejecidas + AL	
Latencia de entrada al cuadrante objetivo (s)	12.01 ± 2.294 (n=6)	5.198 ± 0.3923 (n=6)	<0.05*
Tiempo en el cuadrante objetivo (s)	20.45 ± 4.994 (n=6)	25.18 ± 7.08 (n=6)	0.5969
Entradas al cuadrante objetivo (#)	7 ± 1.238 (n=6)	4.667 ± 0.8028 (n=6)	0.1449
Distancia recorrida en el cuadrante objetivo (cm)	479.2 ± 145 (n=6)	571.9 ± 111.6 (n=6)	0.6237

7.2.3 EL ACETATO DE LEUPROLIDA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ESPINOFILINA EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ENVEJECIDAS TRAS 5 SEMANAS DE TRATAMIENTO SIN AFECTAR MAP2 O NF-200

En una primera exploración de los posibles cambios que pudiera generar el tratamiento con AL en la plasticidad del hipocampo, se evaluó la expresión de espinofilina, MAP2 y NF-200 en los hipocampos obtenidos tras el sacrificio de los animales del protocolo 1, cuyo tratamiento tuvo una duración de cinco semanas en total. El análisis de la expresión de espinofilina mediante Western blot reveló una banda de aproximadamente 132 kDa en los grupos de animales del protocolo 1. Asimismo, se observó un aumento significativo en la expresión de esta proteína en ratas envejecidas tratadas con AL durante cinco semanas (0.1782 ± 0.0090 ; $n=3$), en comparación con las ratas envejecidas tratadas con solución salina (0.1348 ± 0.0072 ; $n=3$), lo que representa un incremento del 32% ($p < 0.05$) (**Fig. 28**).

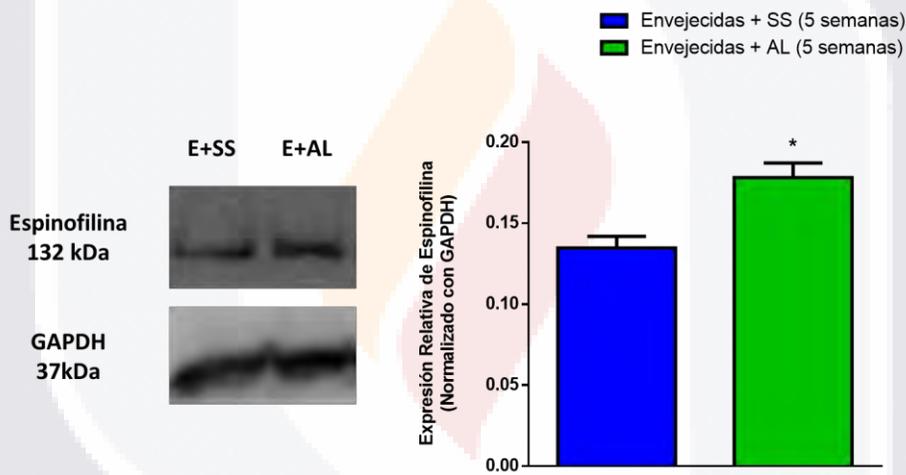


Fig. 28. Expresión de espinofilina en el hipocampo de los animales del protocolo 1. La expresión de espinofilina aumenta en las ratas envejecidas sometidas al tratamiento con AL por 5 semanas. Los valores se expresan como la intensidad relativa media respecto a GAPDH \pm S.E.M; * $p < 0.05$; $n=3$.

En cuanto al análisis de la expresión de MAP2 se revelaron dos bandas en los grupos experimentales: una de aproximadamente 280 kDa (correspondiente a las MAP2 de alto peso molecular) y otra de aproximadamente 70 kDa (correspondiente a las MAP2 de bajo peso molecular). Para el análisis se seleccionó la banda de las MAP2 de bajo peso molecular (MAP2c/d). Los análisis no mostraron diferencias significativas entre los grupos a las cinco semanas de tratamiento (SS: 0.1218 ± 0.01557 ; $n=3$ vs AL: 0.1440 ± 0.01401 ; $n=3$; $p=0.350$) (**Fig. 29**).

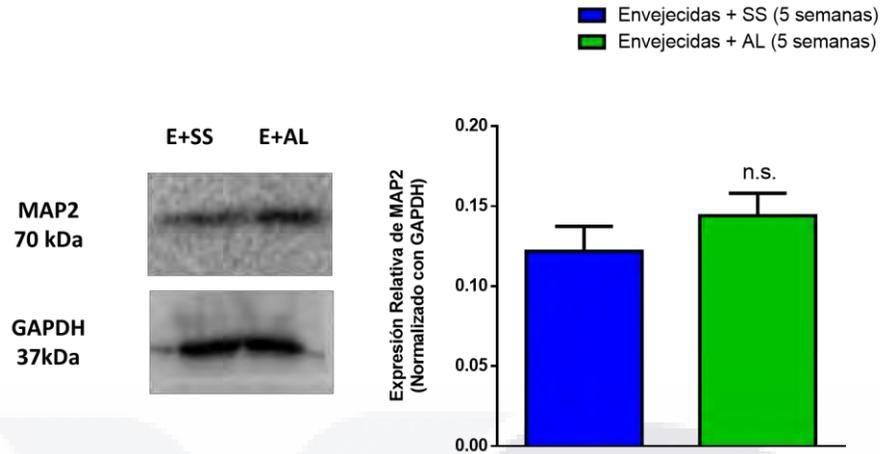


Fig. 29. Expresión de MAP2 en el hipocampo de los animales del protocolo 1. No se observaron diferencias significativas entre los grupos envejecidos que fueron tratados con SS y AL. Los valores se expresan como la intensidad relativa media respecto a GAPDH \pm S.E.M; n=3.

Finalmente, el análisis de NF-200 mostró una banda a 200 kDa en los grupos estudiados. Similar a lo encontrado en MAP2, tampoco se revelaron diferencias significativas en la expresión de esta proteína tras las cinco semanas de tratamiento (SS: 0.4272 ± 0.02279 ; n=3 vs AL: 0.4221 ± 0.01308 ; n=3; $p=0.8578$) (**Fig. 30**).

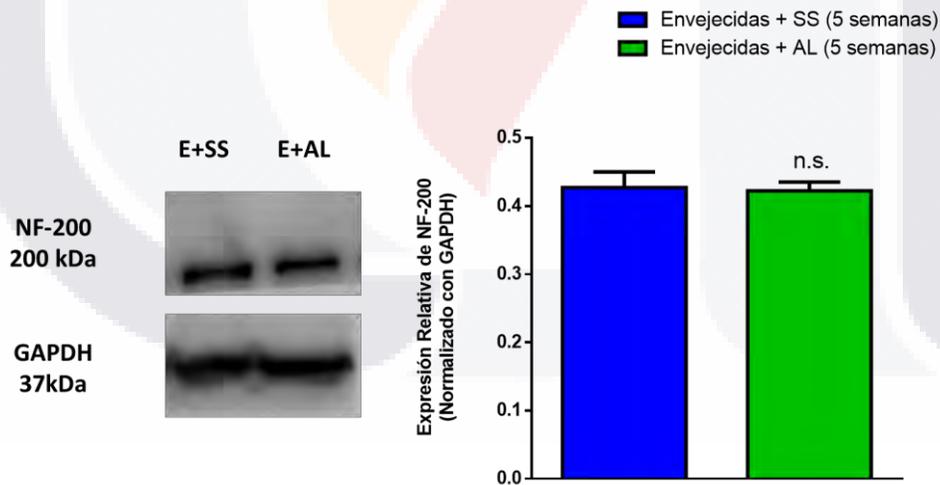


Fig. 30. Expresión de NF-200 en el hipocampo de los animales del protocolo 1. No se observaron diferencias significativas entre los grupos envejecidos. Los valores se expresan como la intensidad relativa media respecto a GAPDH \pm S.E.M; n=3.

7.3 PROTOCOLO 2: TRATAMIENTO POR 9 SEMANAS

7.3.1 CURVA DE APRENDIZAJE DURANTE LA FASE DE ENTRENAMIENTO DEL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante la fase de entrenamiento del protocolo 2, en la cual la prueba del laberinto acuático de Morris se llevó a cabo en las semanas 7, 8 y 9 de tratamiento. En esta fase participaron tanto ratas envejecidas tratadas con SS o AL, como un grupo de ratas jóvenes intactas. Debido al gran número de animales incluidos en este protocolo, la prueba se realizó en diferentes semanas. No obstante, los gráficos que se muestran a continuación reflejan el conjunto total de resultados de todos los animales que formaron parte del protocolo 2.

Durante la fase de adquisición, se observó que la latencia de escape para encontrar la plataforma disminuyó progresivamente en todos los grupos a medida que avanzaban los días de entrenamiento. El ANOVA de medidas repetidas de dos vías reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3, 188)} = 25.92, p < 0.001$) y entre los días de entrenamiento ($F_{(2, 188)} = 6.338, p < 0.005$), pero no en la interacción entre las variables ($F_{(6, 188)} = 0.4381, p = 0.8527$). Específicamente, el grupo envejecido tratado con SS exhibió latencias de escape más largas en comparación con los animales más jóvenes en los días 2 y 3 ($p < 0.05$). Sin embargo, al final de la fase de entrenamiento, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (**Fig. 31A**). Estos resultados indican que el aprendizaje ocurrió en todos los grupos, pero con diferencias en el nivel general de desempeño, lo cual podría atribuirse a factores como el envejecimiento o el efecto del tratamiento administrado.

Por su parte, las puntuaciones de los índices de aprendizaje obtenidos por cada grupo experimental mostraron que el grupo de ratas envejecidas + SS (38.38 ± 2.279 s; $n=15$) tardó más en encontrar la plataforma oculta respecto a los animales jóvenes (30.42 ± 2.573 s; $n=12$; $p < 0.05$), mientras que el grupo tratado con AL (35.67 ± 1.463 ; $n=23$) no fue estadísticamente diferente a estos grupos (**Fig. 31B**). Los datos obtenidos apuntan a que el envejecimiento reduce el rendimiento en tareas de aprendizaje espacial, pero el tratamiento con AL podría tener un efecto protector o restaurador parcial.

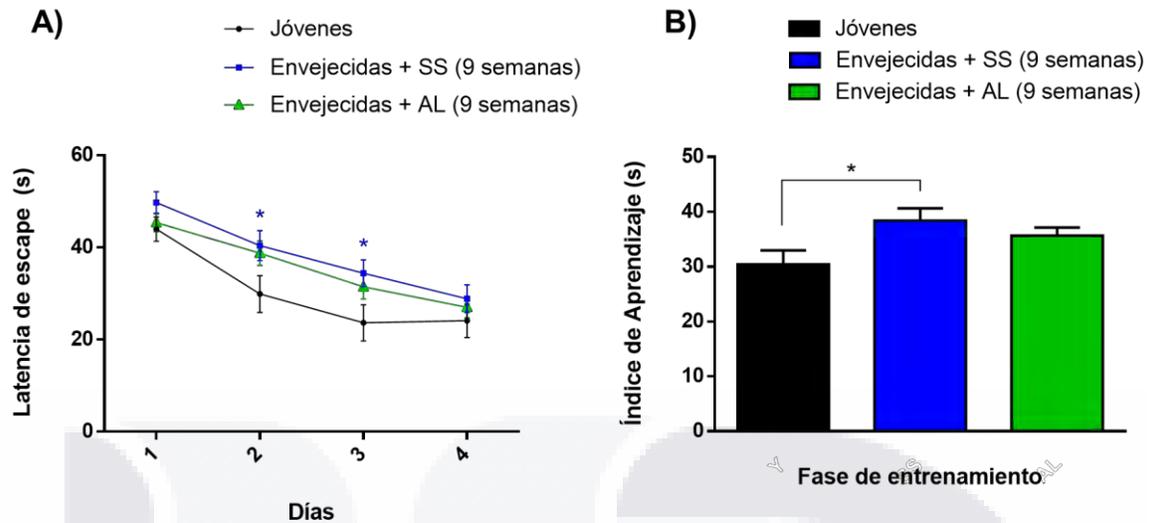


Fig. 31. Resultados del laberinto acuático de Morris durante la fase de adquisición o entrenamiento del protocolo 2. (A) Latencia de escape en segundos para cada uno de los cuatro días de entrenamiento. El grupo envejecido + SS mostró mayores latencias respecto a las ratas jóvenes los días 2 y 3 de entrenamiento. (B) Se muestra el índice de aprendizaje de cada grupo, que representa el promedio de las latencias de escape (s) por los cuatro días que duró la fase de adquisición. El grupo de ratas envejecidas que fueron tratadas con SS tardó en general más tiempo en encontrar la plataforma durante la fase de entrenamiento. Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M.; $p < 0.05$; Jóvenes ($n=12$), Envejecidas + SS ($n=15$), Envejecidas + AL ($n=23$).

7.3.2 EL ACETATO DE LEUPROLIDA MEJORA EL RENDIMIENTO EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS TRAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO

Para la evaluación de los animales incluidos en el protocolo 2 durante la fase de prueba del laberinto acuático de Morris, se registraron los siguientes parámetros: la latencia de entrada al cuadrante objetivo (s), el tiempo total en dicho cuadrante (s), la distancia recorrida dentro del cuadrante objetivo (cm), la distancia total de nado (cm) y la velocidad de nado (cm/s). La latencia, el tiempo y la distancia dentro del cuadrante objetivo fueron considerados como indicadores del rendimiento en la tarea de memoria espacial. Por su parte, la distancia total nadada y la velocidad de nado se utilizaron como medidas complementarias para evaluar posibles diferencias en la locomoción de los animales, en conjunto con los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto.

Los resultados mostraron que las ratas envejecidas tratadas con SS presentaron una mayor latencia de entrada al cuadrante objetivo y pasaron un menor tiempo en dicho cuadrante en comparación con el grupo de ratas jóvenes, lo que sugiere un

deterioro en la memoria espacial asociado al envejecimiento. No obstante, el tratamiento con AL parece atenuar este efecto, ya que las ratas de este grupo mostraron latencias significativamente menores que las tratadas con SS ($F_{(2, 47)} = 5.734, p < 0.05$) (**Fig. 32A, Tabla 7**). Además, el grupo de envejecimiento tratado con AL pasó más tiempo ($F_{(2, 47)} = 3.763, p < 0.05$) (**Fig. 32C, Tabla 7**) y recorrió una distancia mayor ($F_{(2, 47)} = 3.138, p = 0.052$) (**Fig. 32D, Tabla 7**) en el cuadrante objetivo en comparación con el grupo de ratas envejecidas + SS, como lo indican las trayectorias representativas de cada grupo (**Fig. 32B**).

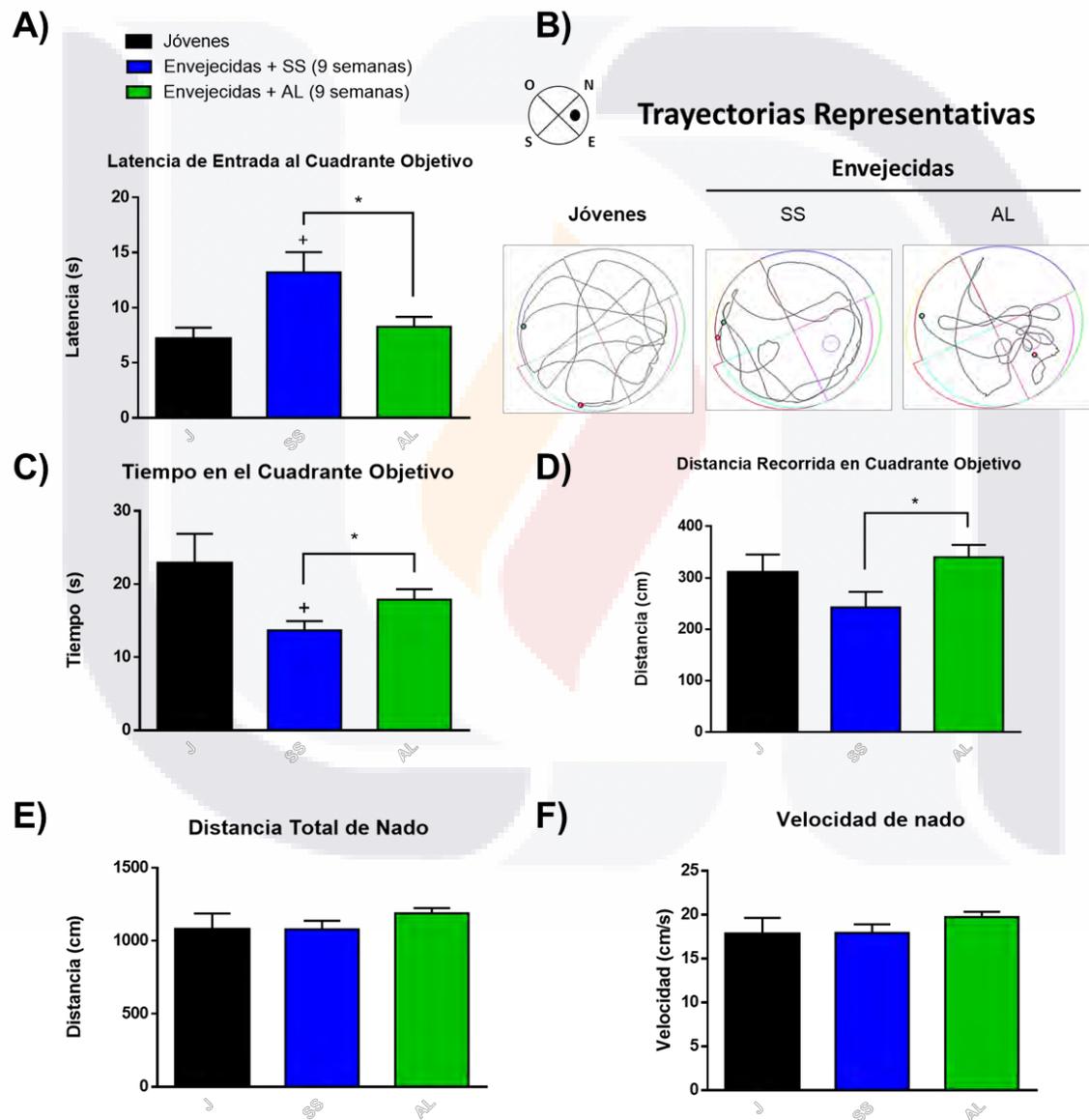


Fig. 32. Resultados de la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en el protocolo 2. (A) Latencia de entrada al cuadrante objetivo (s). (B) Trayectorias de búsqueda representativas para cada grupo. (C) Tiempo en segundos en el cuadrante objetivo. (D) Distancia recorrida en cm en el

cuadrante objetivo. (E) Distancia total de nado en el laberinto (cm). (F) Velocidad de nado (cm/s). Los resultados mostraron un deterioro de la memoria espacial asociado al envejecimiento que se atenúa por el tratamiento con AL. Los datos se muestran como la media \pm S.E.M; * $p < 0.05$; + $p < 0.05$ vs grupo joven; Jóvenes (n=12), Envejecidas + SS (n=15), Envejecidas + AL (n=23).

Asimismo, no se observaron diferencias entre los grupos de animales estudiados en términos de distancia total de nado ($F_{(2, 47)} = 1.213$, $p = 0.3063$) y velocidad de nado ($F_{(2, 47)} = 1.247$, $p = 0.2968$) (**Fig. 32E-F, Tabla 7**). Estos resultados coinciden con los obtenidos en la prueba de campo abierto, lo que refuerza la conclusión de que no existieron alteraciones en el desempeño locomotor entre los grupos analizados.

Tabla 7. Comparación de resultados estadísticos en la fase de prueba del laberinto acuático de Morris en los animales del protocolo 2

Parámetro evaluado	9 semanas de tratamiento			p
	Jóvenes	Envejecidas + SS	Envejecidas + AL	
Latencia de entrada al cuadrante objetivo (s)	7.178 \pm 1.010 (n=12)	13.21 \pm 1.825 (n=15)	8.268 \pm 0.914 (n=23)	<u><0.05*</u>
Tiempo en el cuadrante objetivo (s)	22.86 \pm 4.023 (n=12)	13.68 \pm 1.257 (n=15)	17.88 \pm 1.437 (n=23)	<u><0.05*</u>
Distancia recorrida en el cuadrante objetivo (cm)	310.5 \pm 35.05 (n=12)	242.6 \pm 30.30 (n=15)	340 \pm 24.19 (n=23)	0.052
Distancia total de nado (cm)	1079 \pm 108.5 (n=12)	1080 \pm 58.81 (n=15)	1190 \pm 35.18 (n=23)	0.3063
Velocidad de nado (cm/s)	17.80 \pm 1.823 (n=12)	17.93 \pm 0.9862 (n=15)	19.75 \pm 0.5980 (n=23)	0.2968

7.3.3 LABERINTO EN Y: EL TRATAMIENTO CON ACETATO DE LEUPROLIDA POR 9 SEMANAS MEJORA LA MEMORIA ESPACIAL A CORTO PLAZO

La memoria espacial a corto plazo se evaluó mediante la prueba de alternancia espontánea en el laberinto en Y, como se describió en la sección de métodos. Los

resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos de ratas envejecidas con y sin tratamiento con AL. En particular, el grupo envejecido tratado con AL presentó un menor número total de entradas a los brazos del laberinto en comparación con el grupo envejecido tratado con SS ($F_{(2, 15)} = 4.871, p < 0.05$) (**Fig. 33A, Tabla 8**). Además, este mismo grupo mostró un mayor porcentaje de alternancia espontánea ($F_{(2, 15)} = 5.643, p < 0.05$) (**Fig. 33B, Tabla 8**), lo que sugiere una mejora en la memoria espacial a corto plazo. Cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de ratas envejecidas tratadas con AL o SS y el grupo de ratas jóvenes en los parámetros evaluados.

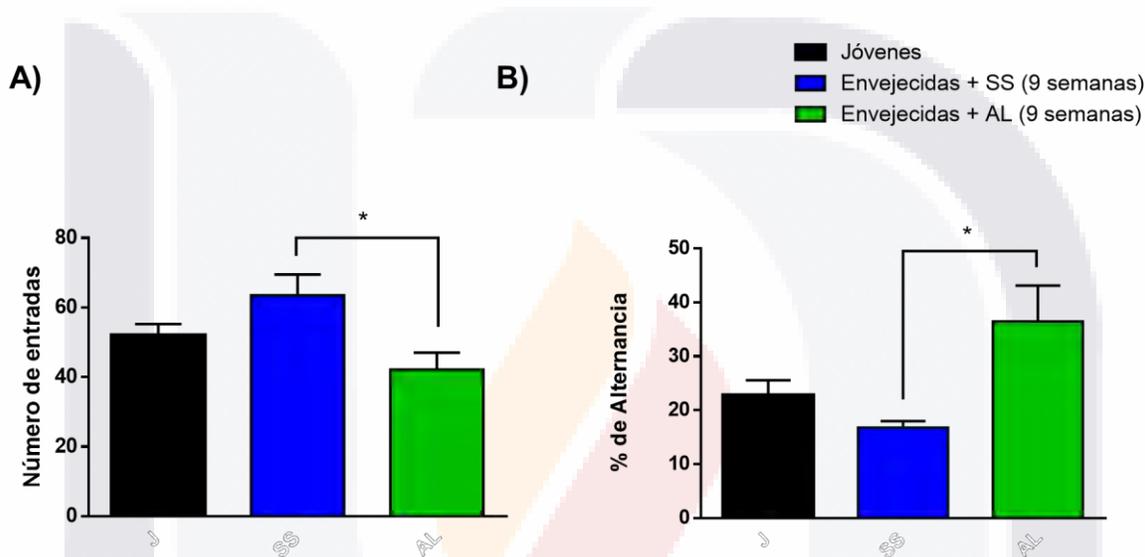


Fig. 33. Resultados de la prueba de laberinto en Y tras 9 semanas de tratamiento. (A) Total de entradas a los brazos del laberinto. (B) Comparación del % de alternancia entre los grupos experimentales. Los datos muestran cambios significativos entre los grupos envejecidos tratados con AL y SS, que parecen indicar un mejor rendimiento en la memoria espacial a corto plazo tras 9 semanas de tratamiento con AL. Los resultados se presentan como la media ± S.E.M; * $p < 0.05$; $n = 6$.

Tabla 8. Comparación de resultados del laberinto en Y en los animales del protocolo 2

Parámetro evaluado	9 semanas de tratamiento			p
	Jóvenes	Envejecidas + SS	Envejecidas + AL	
Número de entradas (#)	52 ± 3.256 (n=6)	63.5 ± 5.982 (n=6)	42.17 ± 4.881 (n=6)	<0.05*
% de Alternancia	22.76 ± 2.826 (n=6)	16.76 ± 1.222 (n=6)	36.42 ± 6.671 (n=6)	<0.05*

7.3.4 EL ACETATO DE LEUPROLIDA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ESPINOFILINA Y MAP2 EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ENVEJECIDAS TRAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO SIN AFECTAR NF-200

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de proteínas relacionadas con procesos de plasticidad del hipocampo revelaron que la espinofilina se encuentra menos expresada en las ratas envejecidas que recibieron tratamiento con SS (0.1348 ± 0.00504 ; $n=6$) respecto al grupo de ratas jóvenes (0.2146 ± 0.01863 ; $n=6$; $p<0.05$), encontrándose reducida en un 37.19%. Sin embargo, el tratamiento con AL por nueve semanas mitiga estos efectos (0.2340 ± 0.03082 ; $n=6$) y parece restaurar los niveles de expresión de espinofilina a los observados en el grupo joven ($F_{(2, 15)} = 6.272$, $p < 0.05$) (**Fig. 34**).

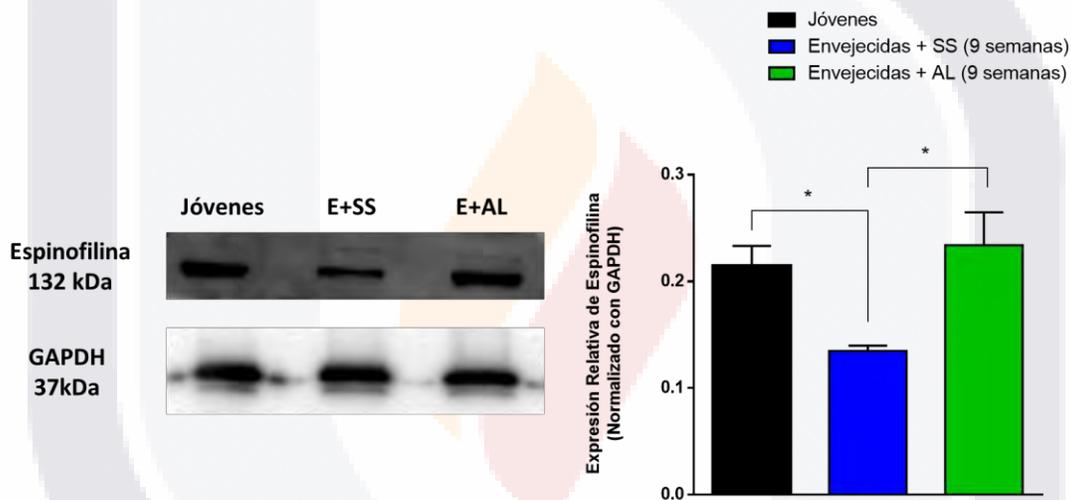


Fig. 34. Expresión de espinofilina en el hipocampo de los animales del protocolo 2. La expresión de espinofilina se reduce con el envejecimiento; sin embargo, el tratamiento con AL por nueve semanas restaura los niveles de expresión de esta proteína a los observados en ratas jóvenes. Los valores se expresan como la intensidad relativa media respecto a GAPDH \pm S.E.M; * $p<0.05$; $n=6$.

De manera similar, se observó una tendencia comparable a los resultados de la espinofilina para la expresión de la proteína MAP2. En este caso, la expresión de MAP2 en el hipocampo de las ratas del grupo joven (0.3028 ± 0.05697 ; $n=3$) fue significativamente mayor que en el grupo de ratas envejecidas con SS (0.1051 ± 0.02128 ; $n=3$; $p<0.05$) en un 65.28% y el tratamiento con AL (0.2310 ± 0.02397 ; $n=3$) atenuó este efecto ($F_{(2, 8)} = 5.554$, $p < 0.05$). En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con AL induce cambios en la plasticidad hipocampal, lo cual podría ser la base de las diferencias observadas en las pruebas conductuales de memoria espacial (**Fig. 35**).

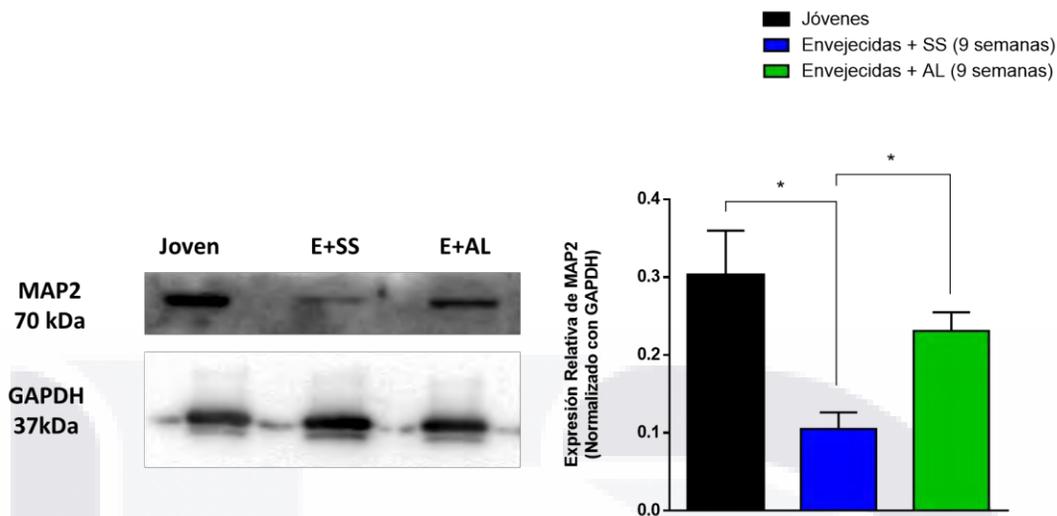


Fig. 35. Expresión de MAP2 en el hipocampo de los animales del protocolo 2. Se observa que el envejecimiento reduce la expresión de esta proteína y el tratamiento con AL mitiga el efecto. Los valores se expresan como la intensidad relativa media respecto a GAPDH \pm S.E.M; n=3.

Finalmente, NF-200 se encontró menos expresada en el grupo joven (0.06868 ± 0.01221 ; n=3) que en los grupos envejecidos (SS: 0.1971 ± 0.02542 , n=3, $p < 0.05$; AL: 0.2388 ± 0.05638 , n=2, $p < 0.05$), sin encontrar diferencias significativas dadas por el tratamiento ($F_{(2,5)} = 9.336$, $p < 0.05$) (**Fig. 36**).

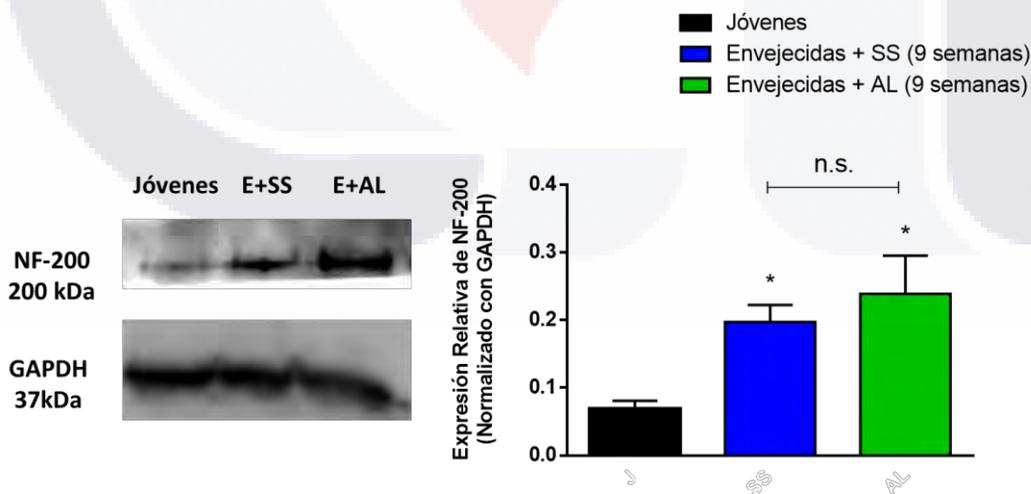


Fig. 36. Expresión de NF-200 en el hipocampo de los animales del protocolo 2. La expresión de NF-200 se encontró significativamente reducida en las ratas jóvenes respecto a los grupos envejecidos, sin diferencias por el tratamiento. Los valores se expresan como la intensidad relativa media respecto a GAPDH \pm S.E.M; * $p < 0.05$; Jóvenes (n=3); E+SS (n=3); E+AL (n=2).

7.3.5 EL TRATAMIENTO CON ACETATO DE LEUPROLIDA DURANTE 9 SEMANAS ATENÚA LAS ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE NÚCLEOS Y EL GROSOR DE LAS CAPAS NEURONALES DEL HIPOCAMPO DADAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN CA3 Y GD

Los estudios sobre la plasticidad del hipocampo, además de las mediciones de los niveles de expresión de proteínas mediante Western blot, incluyeron un análisis histológico de los grupos experimentales para evaluar el efecto del tratamiento en la densidad neuronal de las capas piramidales (CA1, CA2 y CA3) y granulares (GD) del hipocampo. Este efecto se evaluó midiendo el grosor de las capas y contabilizando la cantidad de núcleos por micrómetro (núcleos/ μm), tal como se describió en los métodos.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales en el número de núcleos ($F_{(2, 33)} = 2.553$, $p = 0.0931$) ni en el grosor del estrato ($F_{(2, 33)} = 3.083$, $p = 0.0592$) en CA1 (**Fig. 37A-C, Tabla 9**). Asimismo, en CA2 el análisis del número de núcleos ($F_{(2, 33)} = 1.902$, $p = 0.1652$) y el grosor ($F_{(2, 33)} = 0.6584$, $p = 0.5243$) no mostró diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 37A y 37D-E, Tabla 9**).

En CA3 se observó una disminución significativa del número de núcleos en el grupo envejecido + SS en comparación con el grupo joven ($p < 0.05$), mientras que el grupo envejecido + AL mostró una recuperación significativa de este efecto ($F_{(2, 33)} = 5.218$, $p < 0.05$) (**Fig. 37A y 37F, Tabla 9**). De manera consistente, el grosor de la capa CA3 se vio disminuido de forma significativa en las ratas envejecidas que recibieron el tratamiento con SS respecto a las ratas jóvenes ($p < 0.05$). Sin embargo, el grosor del estrato no presentó cambios significativos entre los grupos envejecidos dados por el tratamiento con AL ($F_{(2, 33)} = 3.090$, $p = 0.0588$) (**Fig. 37A y 37G, Tabla 9**).

Finalmente, en el GD se evidenció una disminución significativa en el número de núcleos en el grupo de ratas envejecidas + SS respecto al grupo joven ($p < 0.001$). Además, el tratamiento con AL logró revertir esta disminución significativamente ($F_{(2, 33)} = 13.08$, $p < 0.001$) (**Fig. 37A y 37H, Tabla 9**). En cuanto al grosor del GD, se observó una disminución significativa en los grupos envejecidos respecto a las ratas jóvenes, tanto en el grupo que recibió SS ($p < 0.001$) como en el que recibió AL ($p < 0.05$). Sin embargo, el grupo de ratas envejecidas + AL mostró una recuperación significativa respecto al grupo envejecido + SS ($F_{(2, 33)} = 67.50$, $p < 0.001$) (**Fig. 37A y 37-I, Tabla 9**).

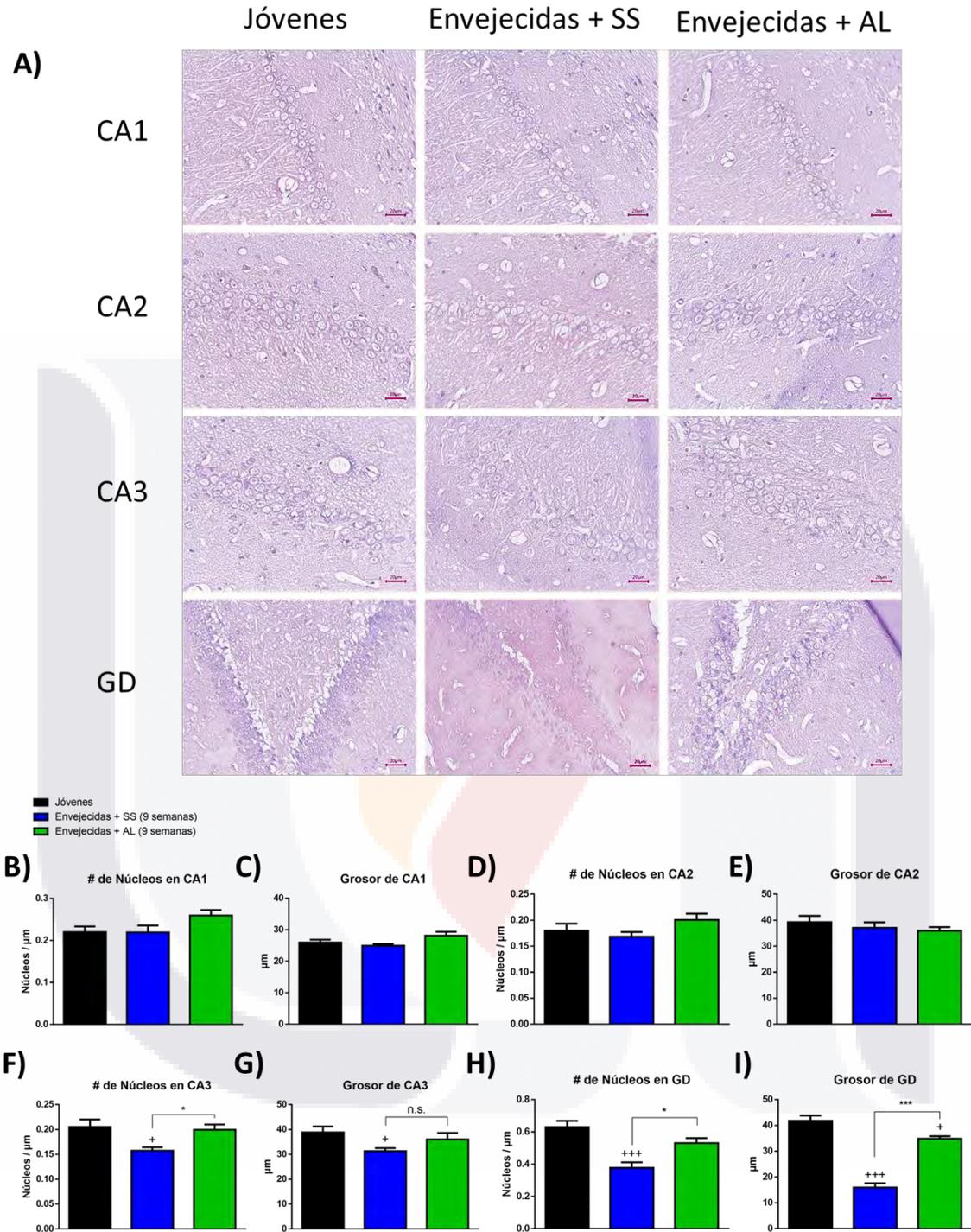


Fig. 37. Resultados histológicos en el hipocampo de los animales del protocolo 2. (A) Se muestran fotografías representativas de cada grupo por área analizada. (B-C) Relación núcleos/ μm y grosor (μm) en CA1. (D-E) Relación núcleos/ μm y grosor (μm) en CA2. (F-G) Relación núcleos/ μm y grosor (μm) en CA3. (H-I) Relación núcleos/ μm y grosor (μm) en GD. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; + $p < 0.05$ y +++ $p < 0.001$ vs ratas jóvenes; $n = 12$.

Tabla 9. Efecto del tratamiento con AL en la relación núcleos/ μm y grosor (μm) de las capas neuronales CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo

Capa neuronal	9 semanas de tratamiento			p
	Jóvenes	Envejecidas + SS	Envejecidas + AL	
<u>Conteo de núcleos/μm</u>				
CA1	0.2199 \pm 0.01335 (n=12)	0.2192 \pm 0.01644 (n=12)	0.2593 \pm 0.01304 (n=12)	0.0931
CA2	0.1796 \pm 0.01375 (n=12)	0.1682 \pm 0.009087 (n=12)	0.2005 \pm 0.01224 (n=12)	0.1652
CA3	0.2051 \pm 0.01512 (n=12)	0.1574 \pm 0.006784 (n=12)	0.1994 \pm 0.01072 (n=12)	<u>p < 0.05*</u>
GD	0.6294 \pm 0.03874 (n=12)	0.3768 \pm 0.03515 (n=12)	0.5306 \pm 0.03132 (n=12)	<u>p < 0.001*</u>
<u>Grosor del estrato (μm)</u>				
CA1	25.96 \pm 0.8826 (n=12)	24.94 \pm 0.5323 (n=12)	28.12 \pm 1.223 (n=12)	0.0592
CA2	39.21 \pm 2.463 (n=12)	37.05 \pm 2.118 (n=12)	35.95 \pm 1.404 (n=12)	0.5243
CA3	38.85 \pm 2.395 (n=12)	31.30 \pm 1.234 (n=12)	36.03 \pm 2.616 (n=12)	0.0588
GD	41.82 \pm 2.009 (n=12)	15.92 \pm 1.694 (n=12)	34.84 \pm 1.037 (n=12)	<u>p < 0.001*</u>

7.3.6 OBSERVACIONES COMPLEMENTARIAS DURANTE EL TRATAMIENTO POR 9 SEMANAS

7.3.6.1 SEGUIMIENTO DEL PESO CORPORAL

Durante las nueve semanas de tratamiento, se realizó un seguimiento semanal del peso corporal de todos los animales envejecidos incluidos en el estudio. Este

monitoreo permitió verificar el estado general de salud y detectar posibles efectos sistémicos derivados del tratamiento.

En los dos grupos envejecidos (SS y AL), se observaron fluctuaciones aparentemente normales del peso a lo largo del tiempo, sin pérdida significativa de masa corporal tras las 9 semanas de tratamiento. El ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1, 371)} = 39.49, p < 0.001$) pero no para el tiempo de tratamiento ($F_{(9, 371)} = 0.4891, p = 0.8819$) ni para la interacción entre variables ($F_{(9, 371)} = 0.3693, p = 0.9493$). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos únicamente en las primeras dos semanas de tratamiento ($p < 0.05$) (**Fig. 38**). Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, el tratamiento no provocó alteraciones marcadas en el peso corporal de los animales.

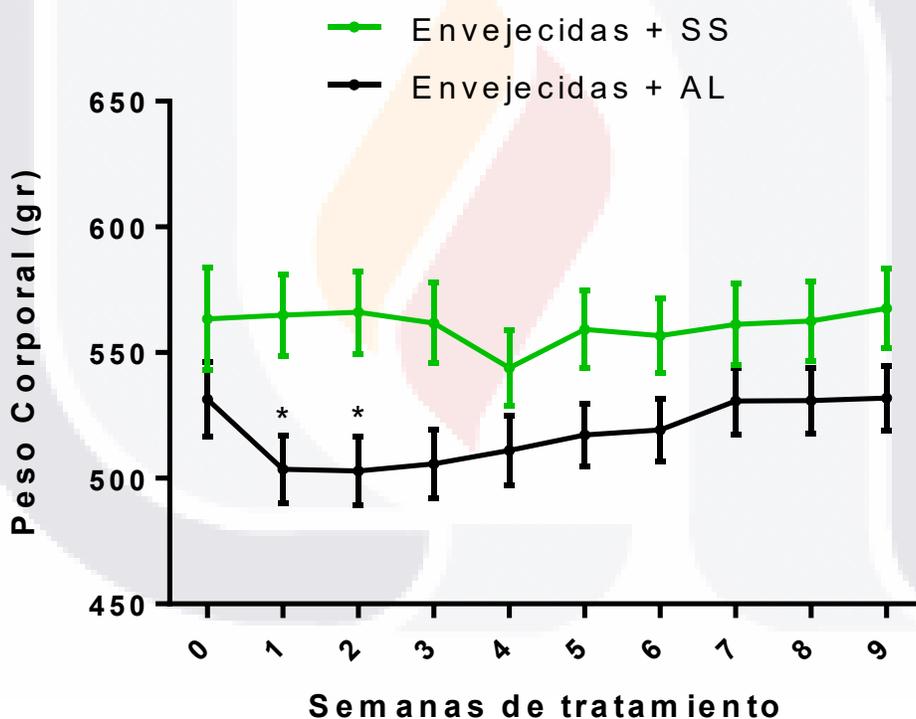


Fig. 38. Seguimiento del peso corporal de los grupos envejecidos durante las 9 semanas de tratamiento. Se observan diferencias significativas entre los grupos tratados con SS y AL únicamente en la semana 1 y 2 de tratamiento. Sin embargo, el tratamiento no provocó alteraciones marcadas en el peso corporal de los animales tras las 9 semanas totales que duró el tratamiento. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M; * $p < 0.05$; Envejecidas + SS (n=15); Envejecidas + AL (n=25).

7.3.6.2 PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA

Asimismo, a lo largo del protocolo de tratamiento se registró la supervivencia de los animales envejecidos. En el grupo tratado con SS (n = 15), todos los animales sobrevivieron hasta el final del experimento. En contraste, en el grupo tratado con AL (n = 25), se observó la muerte espontánea de dos animales durante la quinta y sexta semana de tratamiento, lo que representa un 8% de mortalidad en ese grupo. Aunque estas muertes no fueron suficientes para realizar un análisis estadístico robusto, se documentaron y representaron mediante una curva de supervivencia tipo Kaplan-Meier, como se muestra en la **Fig.39**. Este hallazgo indica que, aunque el tratamiento fue bien tolerado en la mayoría de los casos, podrían existir efectos adversos asociados a una exposición prolongada.

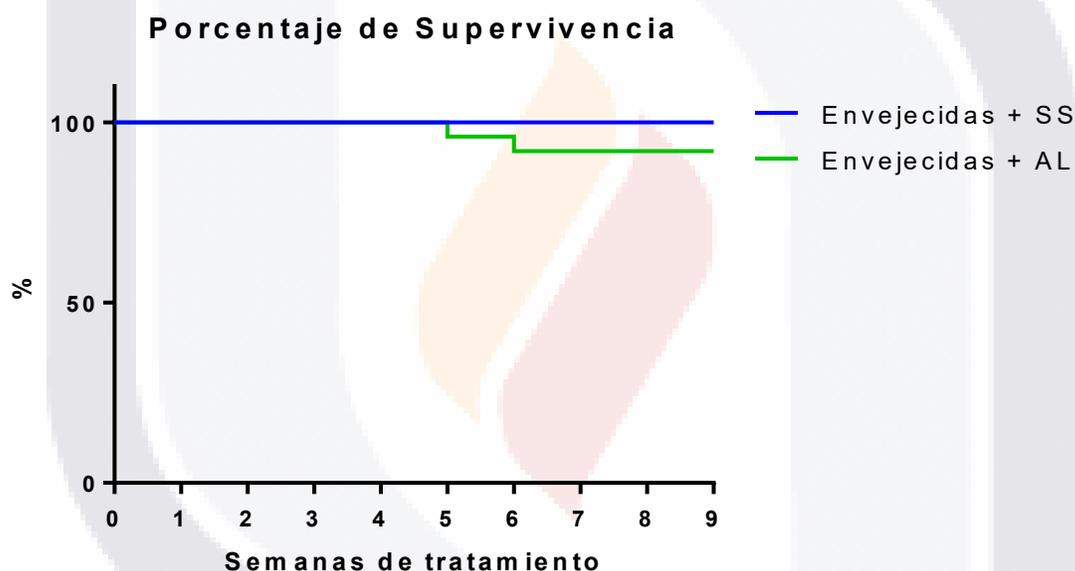


Fig. 39. Porcentaje de supervivencia en los grupos envejecidos tratados por 9 semanas. En el grupo tratado con SS (n = 15), todos los animales sobrevivieron hasta el final del experimento, mientras que el grupo tratado con AL (n=25) presentó un 8% de mortalidad.

7.3.6.3 HALLAZGOS INCIDENTALES: MASA TUMORAL A LA SEMANA 6 Y LESIÓN CUTÁNEA A LA SEMANA 8

Durante el tratamiento de las ratas envejecidas con AL (24 meses de edad al inicio del estudio, n=25) se documentaron hallazgos incidentales que podrían estar relacionados con la edad avanzada de los animales, el tratamiento, o una interacción de ambos factores.

En un ejemplar, se detectó una prominencia anormal en el costado izquierdo a las seis semanas de tratamiento, compatible con una masa subcutánea de crecimiento acelerado (**Fig. 40A**). Dado el tamaño de la lesión y con el objetivo de evitar sufrimiento innecesario, se procedió a la eutanasia del animal el mismo día en que se detectó la anomalía. Este dato fue contemplado en la gráfica de porcentaje de supervivencia del apartado anterior (**Fig.39**). Durante el examen post mortem, se confirmó la presencia de una masa de gran tamaño firmemente adherida a los tejidos subcutáneos, la cual se extendía longitudinalmente a lo largo de buena parte del costado izquierdo del cuerpo, como se muestra en la **Fig. 40B**. La disección reveló una formación de apariencia tumoral que presentaba una forma ovoide, superficie externa lisa, coloración pálida y ligera vascularización, sin ulceraciones ni signos macroscópicos evidentes de necrosis. En la **Fig. 40C** también se observa la masa tras su aislamiento.

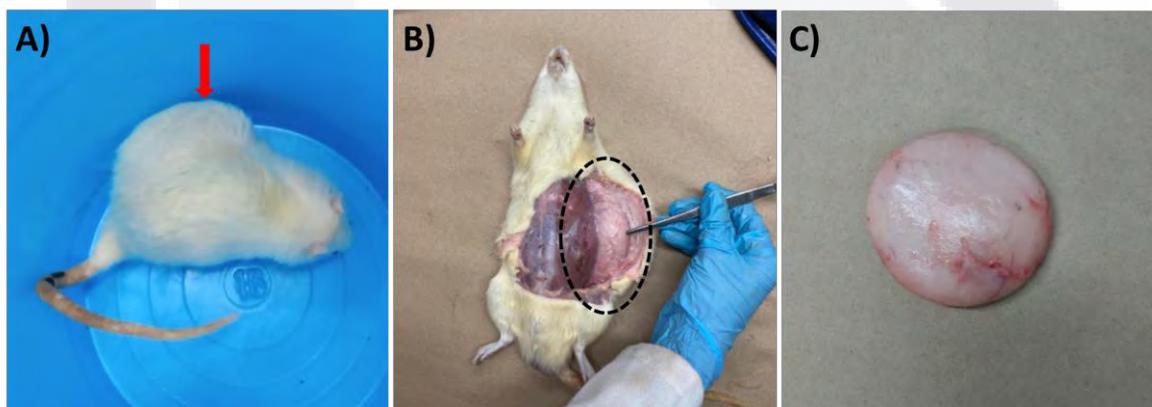


Fig. 40. Hallazgo tumoral incidental en rata envejecida tratada con AL por 6 semanas. (A) En la fotografía se indica con la flecha roja la presencia de la prominencia subcutánea detectada en el flanco izquierdo del animal. (B) Exposición del tumor (delimitado por las líneas punteadas) aún adherido al tejido subcutáneo tras la disección parcial. (C) Tumor completamente aislado que muestra una forma ovoide, superficie externa lisa, coloración pálida y ligera vascularización.

Debido a que no se realizó un análisis histopatológico, no fue posible determinar la naturaleza exacta de la lesión (benigna o maligna). No obstante, la aparición de una masa de tal tamaño tras varias semanas de exposición al tratamiento con AL sugiere la posibilidad de un efecto adverso, aunque también se considera la probabilidad de una lesión espontánea dada por el envejecimiento, dado el carácter aislado del hallazgo.

En un segundo individuo del mismo grupo, tras ocho semanas de tratamiento con el fármaco, además se observó de manera incidental una lesión cutánea localizada en la región dorsal torácica (**Fig. 41**). La lesión se caracterizaba por una úlcera

superficial de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, con bordes ligeramente elevados y un centro de aspecto necrótico o costroso. La zona circundante mostraba pérdida focal de pelaje y leve enrojecimiento. No se detectaron signos sistémicos evidentes de enfermedad en el animal afectado. No se realizó análisis histopatológico, por lo que no fue posible determinar la etiología precisa de la lesión (inflamatoria, infecciosa o neoplásica). No obstante, su aparición posterior al tratamiento sugiere la posibilidad de una reacción cutánea adversa relacionada con la administración crónica del compuesto.

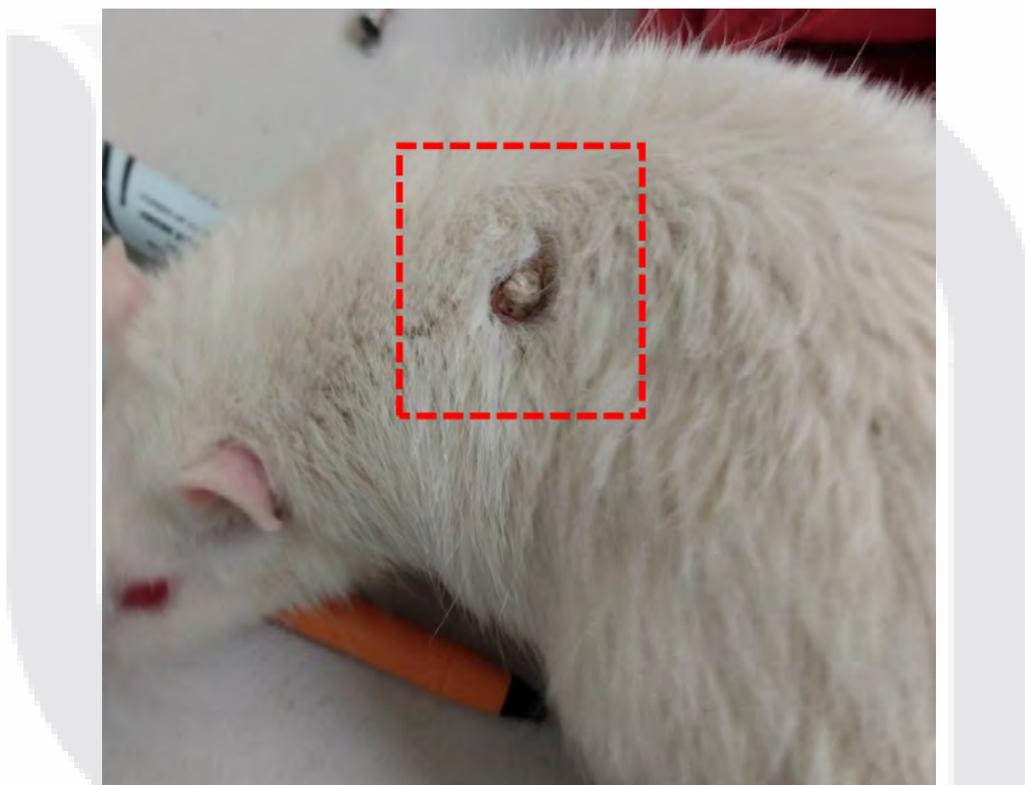


Fig. 41. Hallazgo de lesión cutánea incidental en rata envejecida tratada con AL por 8 semanas. En la fotografía se observa una lesión (delimitada con líneas punteadas) en el dorso del animal de aproximadamente 0.5cm de diámetro, con bordes ligeramente elevados y un centro de aspecto necrótico o costroso.

Los eventos descritos en este capítulo, aunque incidentales, ponen en evidencia la importancia de la vigilancia constante durante estudios que implican tratamientos farmacológicos prolongados, y la necesidad de realizar evaluaciones complementarias, como análisis histopatológicos, que permitan caracterizar adecuadamente alteraciones inesperadas durante ensayos preclínicos.

8. DISCUSIÓN

Los hallazgos de este trabajo proporcionan evidencia conductual, molecular e histológica que respalda la hipótesis de que el tratamiento con AL mejora la memoria espacial en ratas macho envejecidas, y podría atenuar el deterioro de las funciones hipocampales asociado al envejecimiento. Estudios previos han documentado un declive en el rendimiento durante la prueba del laberinto de agua de Morris (Gallagher et al., 2015; Hendrickx et al., 2022; Long et al., 2009), así como una disminución general de la memoria espacial en diversas especies animales (Barnes, 1979; Lacreuse et al., 2005; Luine et al., 2011; Shukitt-Hale et al., 2004) y humanos (León et al., 2016; Moffat et al., 2001; Perrochon et al., 2018). Este deterioro se ha relacionado con múltiples alteraciones cerebrales propias del envejecimiento, entre ellas la acumulación de mutaciones somáticas en neuronas del hipocampo (Lodato et al., 2018), alteraciones en la función sináptica hipocampal (Burke & Barnes, 2010), reducciones del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el líquido cefalorraquídeo (Li et al., 2009), así como la reducción del volumen en regiones clave como la corteza frontal y temporal, el putamen, el tálamo, el núcleo accumbens y el propio hipocampo (Fjell & Walhovd, 2010).

Estudios previos han confirmado la presencia de receptores de GnRH en el hipocampo (Leblanc et al., 1988) y han sugerido que esta hormona puede alcanzar los receptores de dicha región principalmente a través del líquido cefalorraquídeo (Caraty & Skinner, 2008). Este hallazgo podría explicar cómo un análogo de GnRH, como el AL, administrado por vía intramuscular, puede modular funciones dependientes del hipocampo, como la memoria espacial, tal como se observó en este trabajo. Es importante señalar que, debido a su baja biodisponibilidad por vía oral, el AL se administra comúnmente por vías parenterales, como la inyección subcutánea o intramuscular. Además, se ha demostrado que la vía intramuscular puede minimizar las reacciones adversas locales asociadas a su administración (Periti et al., 2002). Por otro lado, existe evidencia de que el AL es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, lo que permite su acción directa sobre el sistema nervioso central, incluyendo el hipocampo (Barrera et al., 1991).

El hipocampo desempeña un papel fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria espacial (Morris et al., 1982). Sin embargo, esta estructura cerebral es especialmente susceptible a los efectos del envejecimiento (Bettio et al., 2017), lo que puede afectar negativamente el rendimiento en tareas espaciales, como la prueba del laberinto acuático de Morris, en modelos animales de edad avanzada. Los resultados obtenidos mediante esta prueba mostraron que las ratas envejecidas que recibieron SS por vía intramuscular presentaron déficits significativos en la memoria espacial en comparación con ratas jóvenes, lo que concuerda con la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

literatura que describe un deterioro cognitivo progresivo asociado al envejecimiento (Gallagher et al., 2015; Hendrickx et al., 2022; Long et al., 2009). No obstante, las ratas envejecidas tratadas con AL mostraron una mejora significativa en su desempeño de esta tarea, evidenciada por una menor latencia para ingresar al cuadrante objetivo, así como por un mayor tiempo de permanencia y una mayor distancia recorrida dentro de dicho cuadrante durante la fase de prueba. Estos indicadores sugieren una recuperación en la capacidad de orientación espacial. Además, el rendimiento del grupo tratado con AL se aproximó notablemente al de las ratas jóvenes, lo que refuerza la hipótesis de que el fármaco podría ejercer un efecto neuroprotector o incluso restaurador sobre las funciones cognitivas comprometidas por la edad. Es importante resaltar que previamente, en otros modelos experimentales se ha demostrado que este fármaco tiene efectos potenciales sobre la regeneración neuronal, siendo efectivo en la recuperación de lesiones de la médula espinal (Díaz Galindo et al., 2015; Palacios et al., 2022), lesiones del nervio ciático (Hernández-Jasso et al., 2020) y glaucoma (Esparza-Leal et al., 2022). Asimismo, el AL se ha propuesto como un tratamiento potencial para contribuir a la estabilización del deterioro cognitivo asociado a la EA (LaPlante et al., 2006)

Por otro lado, dado que la evaluación de la memoria espacial mediante el laberinto acuático de Morris se llevó a cabo bajo dos protocolos con distintos tiempos de tratamiento, los resultados sugieren que los efectos beneficiosos del AL podrían depender de la duración de su administración. Específicamente, tras nueve semanas de tratamiento, las mejoras en la memoria espacial fueron más pronunciadas en comparación con las observadas a las cinco semanas. Se plantea un posible efecto dado por la acumulación del fármaco en el hipocampo tras este periodo. En apoyo a esta hipótesis, un estudio clínico de 48 semanas en mujeres con enfermedad de Alzheimer evaluó el impacto de distintas dosis de AL (11.25 mg vs. 22.5 mg cada 12 semanas), encontrando que, en pacientes que también recibían inhibidores de la acetilcolinesterasa, la dosis más alta se asoció con un menor declive cognitivo en comparación con la dosis baja y el placebo (Bowen et al., 2015). Estos hallazgos refuerzan la posibilidad de un efecto dependiente de la dosis y la duración del tratamiento en la preservación de la función cognitiva. No obstante, se requieren estudios adicionales que exploren con mayor profundidad la eficacia del AL en diferentes ventanas temporales.

Es importante considerar que algunos parámetros evaluados en la prueba del laberinto de Morris pueden verse influenciados por factores físicos asociados al envejecimiento, tales como el aumento de peso corporal, la disminución de la fuerza muscular, la reducción en la velocidad de desplazamiento o cambios en la masa corporal total (Altun et al., 2007; Seidler et al., 2010). Estas variables pueden afectar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

el rendimiento motor de los animales, y en consecuencia, interferir en la interpretación de los resultados cognitivos, dando lugar a posibles sesgos si no se controlan adecuadamente. Durante el protocolo experimental, se realizó un seguimiento del peso corporal en los animales envejecidos tratados con AL y en los controles envejecidos que recibieron solución salina. El monitoreo, llevado a cabo a lo largo de nueve semanas, no evidenció diferencias significativas entre ambos grupos, lo que sugiere que la administración del fármaco no tuvo un impacto relevante sobre el peso corporal que pudiera comprometer el rendimiento físico de los sujetos.

Por otro lado, estudios previos en un modelo de lesión medular en ratas, reportaron que la administración de AL durante cinco semanas resultó en mejoras significativas en la locomoción (Díaz Galindo et al., 2015). Sin embargo, en la prueba de campo abierto, así como en las variables locomotoras específicas registradas durante el desempeño en el laberinto de Morris (como la distancia total recorrida y la velocidad de nado), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas jóvenes y envejecidas (tratadas o no con AL). Estos resultados permiten atribuir con mayor confianza que las mejoras observadas en la memoria espacial tras el tratamiento con AL están relacionadas con una modulación de los procesos cognitivos y no se deben a limitaciones motoras o del estado físico general del grupo no tratado.

Por otra parte, algunos autores han cuestionado la idoneidad del laberinto acuático de Morris como herramienta exclusiva para evaluar la memoria espacial en ratas envejecidas, dado que esta prueba implica una experiencia potencialmente estresante para los animales (Warner & Drugan, 2012). Con el fin de mitigar estas limitaciones y fortalecer la validez de los hallazgos conductuales, se incorporó una prueba complementaria de menor impacto físico: el laberinto en Y. Tradicionalmente, esta prueba permite examinar la memoria de trabajo espacial a través de la alternancia espontánea entre los brazos, un comportamiento guiado por la tendencia natural de los roedores a explorar entornos novedosos y que está asociado principalmente con la actividad de la corteza prefrontal (Kraeuter et al., 2019). Sin embargo, con el fin de ampliar la evaluación hacia procesos de memoria de referencia, en esta prueba se incorporaron señales visuoespaciales diferenciadas en cada uno de los brazos del laberinto.

La memoria de referencia implica la capacidad de recordar información constante sobre el entorno, como la ubicación de señales específicas, y se evalúa mediante tareas que requieren que el animal recuerde y utilice estas señales para tomar decisiones (Sloan et al., 2006). Esta forma de memoria espacial sostenida en el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tiempo depende del hipocampo y en humanos, se ha asociado funcionalmente con aspectos de la memoria episódica (Kennedy & Shapiro, 2004). En la versión modificada del laberinto en Y que incorporó señales visuales diferenciadas en cada brazo, los animales exploraron libremente el dispositivo durante 10 minutos, y se registró el porcentaje de alternancia espontánea como indicador de memoria espacial a corto plazo. Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron que las ratas envejecidas tratadas con AL presentaron un porcentaje de alternancia significativamente superior al observado en las ratas envejecidas no tratadas, lo que indica una mejora en la capacidad de retener y actualizar información espacial en intervalos cortos. Este hallazgo refuerza los efectos positivos del tratamiento con AL sobre la función cognitiva, y sugiere que los beneficios observados no se limitan a una única modalidad de evaluación.

En conjunto, los resultados conductuales sugieren que el tratamiento con AL podría atenuar el deterioro de la memoria espacial asociado con el envejecimiento. Este efecto podría estar mediado por la modulación de los receptores de GnRH presentes en el hipocampo (Leblanc, Crumeyrolle, Latouche, Jordan, Fillion, L'Heritier, Kordon, Dussaillant, Rostene, et al., 1988), lo que a su vez favorecería un mejor desempeño en tareas espaciales. Asimismo, la acción del fármaco podría involucrar la regulación de mecanismos relacionados con la plasticidad sináptica (Carasatorre et al., 2016; Leuner & Shors, 2004), el estímulo de la neurogénesis (Gould et al., 1999; Sahay et al., 2011) o la regulación de la expresión génica asociada con funciones cognitivas (Rosales-Reynoso et al., 2016), todos procesos clave para la memoria espacial y la integridad funcional del hipocampo. Con el fin de explorar con mayor profundidad los efectos del AL en esta estructura, se evaluaron alteraciones histológicas en las capas neuronales, así como cambios en proteínas asociadas a la neuroplasticidad en los hipocampos colectados a partir de los animales que integraron los grupos experimentales.

Estudios previos han reportado una disminución progresiva en la densidad y complejidad de las espinas dendríticas en el hipocampo con el envejecimiento, fenómeno que se ha asociado con un deterioro en la plasticidad sináptica y en funciones cognitivas dependientes de esta región (Duan et al., 2003). No obstante, se ha demostrado que el tratamiento con GnRH puede revertir parcialmente este deterioro estructural, promoviendo un aumento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocámpales (Prange-Kiel et al., 2008). En este contexto, cobra especial relevancia el análisis de proteínas estructurales asociadas con procesos de plasticidad sináptica como la espinofilina, MAP2 y NF-200 que se estudiaron en este trabajo. Anteriormente se ha reportado que la GnRH promueve una mayor expresión de espinofilina en ratas envejecidas y que este cambio

fundamenta las mejoras en el desempeño de tareas de aprendizaje debidas a su administración (González-Torres et al., 2019)

Consistente con los resultados conductuales, en el presente estudio se observó una disminución significativa en la expresión de espinofilina y MAP2 en el grupo de ratas envejecidas tratadas con solución salina, en comparación con el grupo joven, lo cual sugiere una pérdida de integridad estructural en las neuronas del hipocampo asociada al envejecimiento, que podría fundamentar el déficit cognitivo encontrado en este grupo. La espinofilina (también conocida como neurabina II) destaca por su interacción con componentes clave del citoesqueleto, como la actina, la cual es fundamental para la formación, el mantenimiento y la morfología de las espinas dendríticas (Feng et al., 2000). Por su parte, MAP2 juega un papel esencial en la estabilización de la arquitectura dendrítica, siendo un marcador comúnmente utilizado para evaluar la integridad estructural de las neuronas (Bodakuntla et al., 2019). Cabe destacar que el tratamiento con AL logró revertir los efectos dados por el envejecimiento, restableciendo la expresión de ambas proteínas a niveles comparables con los observados en el grupo de ratas jóvenes. Además, estos efectos moleculares parecen depender del tiempo de administración del tratamiento, en concordancia con los hallazgos conductuales previamente descritos. A las cinco semanas, se observó un aumento significativo en la expresión de espinofilina, mientras que los niveles de MAP2 no presentaron cambios relevantes. En contraste, tras nueve semanas de tratamiento, se evidenció una recuperación en la expresión de ambas proteínas, lo que sugiere un efecto acumulativo del fármaco sobre la estructura sináptica y dendrítica.

Así, los datos obtenidos sugieren que el tratamiento con AL podría inducir cambios positivos en la morfología dendrítica del hipocampo, favoreciendo una mayor densidad y estabilidad de espinas, de forma similar a lo observado en modelos tratados con GnRH (Prange-Kiel et al., 2008). No obstante, este hallazgo requiere ser respaldado mediante técnicas que permitan la visualización directa de dichas estructuras en el hipocampo. Estudios recientes ha demostrado que la administración crónica de GnRH en ratas con lesión medular induce una notable regulación positiva en la expresión de diversos genes relacionados con la actividad neurotrófica y sinaptogénica (Martínez-Moreno et al., 2024) En este sentido, un posible mecanismo subyacente a los efectos observados podría implicar la activación de receptores hipocampales de GnRH por el AL, que desencadenaría vías de señalización intracelular asociadas a la regulación positiva de genes clave en la sinaptogénesis, como los que codifican la espinofilina y MAP2.

Por otro lado, se ha propuesto que la GnRH incrementa el número de espinas inmunorreactivas a espinofilina (y por tanto su expresión) a través de una regulación de la síntesis de estrógenos en el hipocampo (Hao et al., 2003; Prange-Kiel et al., 2008). Este mecanismo a su vez podría estar implicado en los efectos observados con el tratamiento con AL. No obstante, investigaciones previas han demostrado que la mejora cognitiva en ratas envejecidas gonadectomizadas tratadas con GnRH parece ser independiente de las hormonas sexuales (González-Torres et al., 2019). Asimismo, estudios *in vitro* han revelado efectos neurotróficos de la GnRH en neuronas cultivadas incluso en ausencia de esteroides sexuales (Quintanar et al., 2016). Por tanto, se puede considerar que los efectos observados son atribuibles principalmente a la acción neurotrófica directa del análogo de la GnRH.

De manera complementaria, se evaluó la expresión de la proteína neurofilamentos de alto peso molecular (NF-200), un marcador relacionado con la organización del citoesqueleto neuronal y la plasticidad sináptica (Zhao et al., 2021). A diferencia de lo observado con espinofilina y MAP2, los niveles de NF-200, en lugar de disminuir, se encontraron aumentados tanto en el grupo envejecido que recibió solución salina como en el que fue tratado con AL, en comparación con las ratas jóvenes. Este incremento relacionado con la edad ha sido previamente documentado, observándose una mayor inmunoreactividad para neurofilamentos en neuronas piramidales del área CA1 en tejido hipocampal de individuos de 49 años o más, así como en pacientes con EA (Vickers et al., 1994). Por lo anterior, la sobreexpresión de NF-200 podría representar un cambio compensatorio asociado al envejecimiento, más que una respuesta específica al tratamiento.

Además, se ha reportado que la GnRH estimula un aumento de este tipo de neurofilamentos y la expresión de espinofilina en neuronas en cultivo (Quintanar et al., 2016). Sin embargo, aunque en este estudio se observó un aumento de espinofilina tras el tratamiento con AL, los niveles de NF-200 no mostraron diferencias significativas entre las ratas envejecidas tratadas con AL y aquellas que recibieron solución salina. La ausencia de diferencias significativas entre estos grupos indica que la administración de AL no modula sustancialmente la expresión de esta proteína en el hipocampo, al menos en los tiempos evaluados. En conjunto, los resultados de espinofilina, MAP2 y NF-200 destacan la complejidad de los cambios moleculares asociados al envejecimiento y evidencian la especificidad de los efectos del tratamiento sobre ciertos componentes estructurales de las neuronas hipocampales.

En los últimos años, diversos estudios han señalado que las regiones dorsales del hipocampo están particularmente involucradas en la codificación y recuperación de

la memoria espacial, mientras que las áreas ventrales se han relacionado con la regulación de conductas emocionales, como la ansiedad (Bannerman et al., 2003, 2004, 2014). En este contexto, el presente estudio incluyó también un análisis histológico del hipocampo dorsal. Para ello, se evaluaron el grosor y la densidad celular (núcleos/ μm) en distintas regiones del hipocampo, específicamente en las capas piramidales de CA1, CA2, CA3 y en la capa granular del GD. Cabe señalar, además de inducir un aumento en el número de espinas dendríticas (Prange-Kiel et al., 2008; Quintanar et al., 2016) se ha reportado también que la GnRH es capaz de promover procesos de neurogénesis en regiones como el hipotálamo (Ceriani & Whitlock, 2021). Así, este análisis permitió explorar si los efectos observados en la expresión de proteínas sinápticas tras el tratamiento con AL se debían a una pérdida o preservación de cuerpos neuronales.

Los resultados indicaron una disminución en el grosor de la capa y en la densidad neuronal que fue significativa únicamente en las regiones CA3 y GD del hipocampo en las ratas envejecidas tratadas con solución salina, en comparación con el grupo joven. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Wilson et al. (2005), quienes señalaron que las alteraciones asociadas al envejecimiento en el hipocampo son específicas de cada subregión, destacando una contribución particularmente relevante de la disfunción de CA3 al deterioro de la memoria relacionado con la edad (Wilson et al., 2005). Asimismo, se ha descrito que el GD es una de las subregiones más vulnerables a la pérdida celular tanto en el envejecimiento normal (Ngwenya et al., 2015) como en patologías neurodegenerativas, incluidas las demencias (Kawles et al., 2023).

Por su parte, el tratamiento con AL en ratas macho envejecidas revirtió la disminución observada en ambas regiones hipocampales. En este sentido, el aumento en la expresión de espinofilina y MAP2 observado en este estudio podría estar reflejando una mejor preservación de la integridad celular en el GD y CA3, posiblemente acompañada por una mayor arborización dendrítica, aspecto que deberá explorarse en estudios posteriores mediante técnicas más específicas. De manera destacable, estos efectos fueron más pronunciados en el GD, lo que sugiere un posible efecto neurogénico del fármaco, dado que esta región se reconoce como un sitio donde persiste la neurogénesis en el cerebro adulto (Seri & Alvarez-Buylla, 2002). Además, numerosos estudios han demostrado que el proceso neurogénico en el GD es particularmente sensible a señales hormonales y factores neurotróficos (Brummelte & Galea, 2010; Galea, 2008; Pinnock & Herbert, 2008; Schoenfeld & Gould, 2012; Wan et al., 2021). Uno de estos estudios, reportó una modulación diferencial de la neurogénesis en el GD de roedores adultos machos y hembras, destacando que en los machos dicha neurogénesis está influida principalmente por la supervivencia celular, más que por la proliferación (Galea, 2008). Estos

resultados refuerzan la hipótesis de que el análogo de la GnRH podría contribuir a la preservación de la arquitectura hipocampal durante el envejecimiento, lo que concuerda con los hallazgos conductuales y moleculares de este trabajo.

Finalmente, cabe señalar que, durante el periodo de tratamiento de nueve semanas, se presentaron hallazgos incidentales que merecen ser considerados en la interpretación general de los resultados. En el grupo de animales envejecidos tratados con AL se registró una tasa de mortandad del 8%, así como la aparición de un tumor subcutáneo en un individuo y una lesión dérmica ulcerativa en otro. En contraste, en el grupo tratado con solución salina no se observaron casos de mortandad ni lesiones similares. Si bien estos eventos no pueden vincularse de forma concluyente al tratamiento, coinciden con reportes previos sobre efectos adversos asociados al uso de análogos de GnRH. En particular, se ha documentado que pacientes tratados con leuprorelina en su formulación de liberación prolongada desarrollaron bultos subcutáneos en los sitios de inyección. Estos bultos fueron identificados como reacciones inflamatorias llamadas granulomas, que podrían ser causadas tanto por el medicamento como por los materiales utilizados en su sistema de liberación lenta (Yasukawa et al., 2005). Es relevante señalar que la lesión cutánea observada en uno de los animales del grupo con AL se presentó en la región dorsal torácica, alejada del sitio de inyección, lo que sugiere que la alteración podría no estar directamente relacionada con la aplicación intramuscular. Además, se ha reportado en la literatura que los efectos adversos asociados a los análogos de GnRH, aunque generalmente leves, incluyen sofocos, sudoración, edema periférico, y en algunos casos, reacciones locales como dolor, enrojecimiento o endurecimiento en el sitio de aplicación, especialmente cuando se utilizan formulaciones de liberación prolongada (Periti et al., 2002)

Si bien estas observaciones no permiten establecer una relación causal directa entre el tratamiento con AL y la aparición de estas condiciones, resulta llamativo que todas ocurrieran exclusivamente en el grupo experimental. Es posible que estos hallazgos sean manifestaciones espontáneas del deterioro fisiológico asociado al envejecimiento, que pueden incluir procesos neoplásicos o trastornos cutáneos, comunes en animales de edad avanzada (Maita et al., 1979; Onozato et al., 2012; Sonar et al., 2022; Szymanska et al., 2014). No obstante, la ausencia de estas alteraciones en el grupo tratado con SS sugiere la necesidad de realizar un análisis más exhaustivo en futuros estudios, que incluya evaluaciones histopatológicas y una mayor muestra, con el fin de determinar si estos eventos corresponden a efectos adversos del tratamiento o si son simplemente coincidencias biológicas dentro del espectro de variabilidad individual en modelos envejecidos.

9. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran que la administración del AL tiene un efecto beneficioso sobre la memoria espacial en ratas macho envejecidas. Aunque no se observaron diferencias significativas en la locomoción entre grupos, las ratas envejecidas sin tratamiento presentaron déficits cognitivos evidentes en las tareas de memoria espacial en comparación con animales jóvenes, lo cual confirma la susceptibilidad de esta función al proceso de envejecimiento. De manera destacable, el tratamiento con AL logró revertir dichos déficits, mostrando un rendimiento cognitivo similar al de los animales jóvenes y superior al del grupo envejecido tratado con solución salina.

A nivel molecular, los animales envejecidos que no recibieron tratamiento mostraron una reducción en la expresión de espinofilina y MAP2 en el hipocampo, proteínas asociadas con la integridad sináptica y la arborización dendrítica. Sin embargo, la administración de AL incrementó significativamente la expresión de ambas proteínas, sugiriendo una mejora en la plasticidad estructural del hipocampo. En contraste, la proteína NF-200 se encontró significativamente aumentada en los grupos envejecidos, sin diferencias dadas por el tratamiento con AL. Estos hallazgos permiten vincular los efectos cognitivos observados con modificaciones moleculares específicas en el hipocampo que podrían estar restaurando la función sináptica alterada por el envejecimiento.

La evaluación histológica del hipocampo complementó estos hallazgos, encontrando una disminución importante del grosor y densidad celular específicamente en CA3 y el GD dada por el envejecimiento, que fue revertida por el AL en ambas regiones y de forma más prominente en el GD.

No obstante, este estudio presenta ciertas limitaciones. Otras funciones cognitivas que también se ven afectadas por la edad, como el aprendizaje asociativo o la memoria explícita, no fueron evaluadas. Asimismo, sería necesario analizar el efecto del tratamiento en hembras y en diferentes ventanas de intervención, así como ampliar el análisis molecular a otras proteínas clave en la sinaptogénesis (como sinaptofisina) para delinear con mayor precisión los mecanismos implicados.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que el AL tiene un potencial terapéutico para contrarrestar el deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, posiblemente mediante la restauración de mecanismos de plasticidad neuronal en

el hipocampo. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas para la investigación de análogos de GnRH como moduladores de la función cognitiva en la senescencia, y refuerzan la necesidad de continuar explorando su aplicación en contextos preclínicos y clínicos.



10. REFERENCIAS

- Abbas, K. M., Brady, O. J., Larson, H. J., Trias-Llimós, S., Cummins, S., Langan, S. M., Sartorius, B., Hafiz, A., Jenabi, E., Mohammad Gholi Mezerji, N., Borzouei, S., Azarian, G., Khazaei, S., ... Zhu, C. (2020). Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1160–1203. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30977-6/ATTACHMENT/FED369B3-2DEB-42E3-8852-9E194B36838A/MMC2.PDF](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30977-6/ATTACHMENT/FED369B3-2DEB-42E3-8852-9E194B36838A/MMC2.PDF)
- Abbott, L. F., & Regehr, W. G. (2004). Synaptic computation. *Nature*, 431(7010), 796–803. <https://doi.org/10.1038/NATURE03010>,
- Abraham, W. C. (2003). How long will long-term potentiation last? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), 735–744. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2002.1222>,
- Aguilar-Hernández, L., Vázquez-Hernández, A. J., de-Lima-Mar, D. F., Vázquez-Roque, R. A., Tendilla-Beltrán, H., & Flores, G. (2020). Memory and dendritic spines loss, and dynamic dendritic spines changes are age-dependent in the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101858>
- Altun, M., Bergman, E., Edström, E., Johnson, H., & Ulfhake, B. (2007). Behavioral impairments of the aging rat. *Physiology and Behavior*, 92(5), 911–923. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.06.017>
- Amini, R., Chee, K. H., Swan, J., Mendieta, M., & Williams, T. M. (2019). The Level of Cognitive Impairment and Likelihood of Frequent Hospital Admissions. *Journal of Aging and Health*, 31(6), 967–988. <https://doi.org/10.1177/0898264317747078>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Andrade, C., & Radhakrishnan, R. (2009). The prevention and treatment of cognitive decline and dementia: An overview of recent research on experimental treatments. *Indian Journal of Psychiatry*, 51(1), 12–25. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.44900>,
- Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., & Yuste, R. (2007). Ultrastructure of Dendritic Spines: Correlation Between Synaptic and Spine

Morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131.
<https://doi.org/10.3389/NEURO.01.1.1.010.2007>

Azam, S., Haque, M. E., Balakrishnan, R., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2021). The Ageing Brain: Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.683459>,

Bahk, J. Y., Kim, M. O., Park, M. S., Lee, H. Y., Lee, J. H., Chung, B. C., & Min, S. K. (2008). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in bladder cancer epithelia and GnRH effect on bladder cancer cell proliferation. *Urologia Internationalis*, 80(4), 431–438. <https://doi.org/10.1159/000132703>

Banco Mundial. (2024). *Population ages 65 and above (% of total population) | Data*. United Nations Population Division. World Population Prospects. <https://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.65UP.TO.ZS?end=2023&start=1960&view=chart>

Bannerman, D. M., Grubb, M., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Feldon, J., & Rawlins, J. N. P. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 139(1–2), 197–213.
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00268-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00268-1)

Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H. J., & Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(3), 273–283.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2004.03.004>

Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., Mchugh, S. B., Rawlins, J. N. P., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(3), 181–192.
<https://doi.org/10.1038/NRN3677>

Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J. F., & Alperovitch, A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia: The Three-City cohort study. *Neurology*, 69(20), 1921–1930.
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000278116.37320.52>,

Barense, M. D., Fox, M. T., & Baxter, M. G. (2002). Aged rats are impaired on an attentional set-shifting task sensitive to medial frontal cortex damage in young rats. *Learning and Memory*, 9(4), 191–201. <https://doi.org/10.1101/lm.48602>

Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), 74–104. <https://doi.org/10.1037/H0077579>,

- Barrera, C. M., Kastin, A. J., Fasold, M. B., & Banks, W. A. (1991). Bidirectional saturable transport of LHRH across the blood-brain barrier. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 261(3 24-3). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1991.261.3.E312>,
- Baxter, M. G. (2003). Age-related memory impairment: Is the cure worse than the disease? *Neuron*, 40(4), 669–670. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00715-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00715-3)
- Beneat, S. L., Ngo, C. T., & Olson, I. R. (2020). Dissecting the Fornix in Basic Memory Processes and Neuropsychiatric Disease: A Review. *Brain Connectivity*, 10(7), 331–354. <https://doi.org/10.1089/BRAIN.2020.0749>,
- Bettio, L. E. B., Rajendran, L., & Gil-Mohapel, J. (2017). The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 79, 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 611–622. <https://doi.org/10.1038/NRG1656>
- Bliss, S. P., Navratil, A. M., Xie, J., & Roberson, M. S. (2010). GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), 322–340. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.04.002>
- Bodakuntla, S., Jijumon, A. S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C., & Janke, C. (2019). Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 29(10), 804–819. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.004>
- Boonekamp, J. J., Simons, M. J. P., Hemerik, L., & Verhulst, S. (2013). Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell*, 12(2), 330–332. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12050>
- Bourdenx, M., Koulakiotis, N. S., Sanoudou, D., Bezaud, E., Dehay, B., & Tsarbopoulos, A. (2017). Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Progress in Neurobiology*, 155, 171–193. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.003>
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
- Bowen, R. L., Perry, G., Xiong, C., Smith, M. A., & Atwood, C. S. (2015). A clinical study of lupron depot in the treatment of women with Alzheimer's disease: Preservation of cognitive function in patients taking an acetylcholinesterase inhibitor and treated with high dose lupron over 48 weeks. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(2), 549–560. <https://doi.org/10.3233/JAD-141626>,

- Brady, A. E., Wang, Q., Colbran, R. J., Allen, P. B., Greengard, P., & Limbird, L. E. (2003). Spinophilin stabilizes cell surface expression of α 2B-adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32405–32412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304195200>
- Brem, A. katharine, Ran, K., & Pascual-leone, A. (2013). Learning and memory. *Handbook of Clinical Neurology*, 116, 693–737. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53497-2.00055-3>
- Brito, D. V. C., Esteves, F., Rajado, A. T., Silva, N., Andrade, R., Apolónio, J., Calado, S., Faleiro, L., Matos, C., Marques, N., Marreiros, A., Nzwalo, H., Pais, S., Palmeirim, I., Roberto, V., Simão, S., Joaquim, N., Miranda, R., Pêgas, A., ... Nóbrega, C. (2023). Assessing cognitive decline in the aging brain: lessons from rodent and human studies. *Npj Aging 2023* 9:1, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41514-023-00120-6>
- Brown, A. M., Deuten, A. Y., & Colbran, R. J. (2005). Dopamine depletion alters phosphorylation of striatal proteins in a model of Parkinsonism. *European Journal of Neuroscience*, 22(1), 247–256. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2005.04190.X>,
- Brummelte, S., & Galea, L. A. M. (2010). Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience*, 168(3), 680–690. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.023>
- Burgess, N., Maguire, E. A., & O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 35(4), 625–641. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00830-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00830-9)
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.12.003>
- Burtner, C. R., & Kennedy, B. K. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(8), 567–578. <https://doi.org/10.1038/NRM2944>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, 16(2), 130–138. <https://doi.org/10.1038/NN.3304>,
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plasticity*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/381243>,
- Carasatorre, M., Ramírez-Amaya, V., & Díaz Cintra, S. (2016). Plasticidad sináptica estructural en el hipocampo inducida por la experiencia espacial y sus

implicaciones en el procesamiento de información. *Neurología*, 31(8), 543–549.
<https://doi.org/10.1016/J.NRL.2012.12.005>

Caraty, A., & Skinner, D. C. (2008). Gonadotropin-Releasing Hormone in Third Ventricular Cerebrospinal Fluid: Endogenous Distribution and Exogenous Uptake. *Endocrinology*, 149(10), 5227. <https://doi.org/10.1210/EN.2007-1636>

Caroni, P., Chowdhury, A., & Lahr, M. (2014). Synapse rearrangements upon learning: From divergent-sparse connectivity to dedicated sub-circuits. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 604–614. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.011>

Cascella, M., & Al Khalili, Y. (2025). *Short-Term Memory Impairment*.

Ceriani, R., & Whitlock, K. E. (2021). Gonadotropin releasing hormone (Gnrh) triggers neurogenesis in the hypothalamus of adult zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5926. <https://doi.org/10.3390/IJMS22115926/S1>

Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/NM.4000>,

Chiu, K., Lau, W. M., Lau, H. T., So, K. F., & Chang, R. C. C. (2007). Micro-dissection of rat brain for RNA or protein extraction from specific brain region. *Journal of Visualized Experiments*, 7. <https://doi.org/10.3791/269>

Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41. <https://doi.org/10.1038/SJ.NPP.1301559>,

Cobar, L. F., Yuan, L., & Tashiro, A. (2017). Place cells and long-term potentiation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 206–214. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2016.10.010>,

Conn, P. M., & Crowley, W. F. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. In *Annual Review of Medicine* (Vol. 45, pp. 391–405). Annu Rev Med. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.391>

Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C. M., Parrinello, S., Hodgson, J. G., Chin, K., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2010). A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009188>,

Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D., Trojanowski, J. Q., Rumsey, J. M., Hicks, R., Cameron, J., Chen, D., Chen, W. G., Cohen, L. G., Decharms, C., Duffy, C. J., Eden, G. F., Fetz, E. E., Filart, R., Freund, M., Grant, S. J., ... Vinogradov, S. (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical

applications. *Brain*, 134(6), 1591–1609.
<https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWR039>,

Culig, L., Chu, X., & Bohr, V. A. (2022). Neurogenesis in aging and age-related neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, 78.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101636>

Damoiseaux, J. S. (2017). Effects of aging on functional and structural brain connectivity. *NeuroImage*, 160, 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.01.077>

de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 21(4), 532–540. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205080>

de Magalhães, J. P., Curado, J., & Church, G. M. (2009). Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(7), 875–881.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP073>

De Pittà, M., Brunel, N., & Volterra, A. (2016). Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience*, 323, 43–61.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.001>

DeGiosio, R. A., Grubisha, M. J., MacDonald, M. L., McKinney, B. C., Camacho, C. J., & Sweet, R. A. (2022). More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15.
<https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.974890>,

DeGiosio, R. A., Needham, P. G., Andrews, O. A., Tristan, H., Grubisha, M. J., Brodsky, J. L., Camacho, C., & Sweet, R. A. (2023). Differential regulation of MAP2 by phosphorylation events in proline-rich versus C-terminal domains. *FASEB Journal*, 37(10). <https://doi.org/10.1096/FJ.202300486R>,

Dehmelt, L., & Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB-2004-6-1-204/FIGURES/3>

Di Stefano, G., Casoli, T., Fattoretti, P., Gracciotti, N., Solazzi, M., & Bertoni-Freddari, C. (2001). Distribution of MAP2 in hippocampus and cerebellum of young and old rats by quantitative immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49(8), 1065–1066.
<https://doi.org/10.1177/002215540104900818>,

Díaz Galindo, C., Gómez-González, B., Salinas, E., Calderón-Vallejo, D., Hernández-Jasso, I., Bautista, E., & Quintanar, J. L. (2015). Leuprolide acetate induces structural and functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regeneration Research*, 10(11), 1819–1824. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.170311>

- Dickerson, B. C., & Eichenbaum, H. (2010). The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 86–104. <https://doi.org/10.1038/NPP.2009.126>,
- Dickstein, D. L., Weaver, C. M., Luebke, J. I., & Hof, P. R. (2013). Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience*, *251*, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.077>
- DiMattia, B. V., & Kesner, R. P. (1988). Spatial cognitive maps: differential role of parietal cortex and hippocampal formation. *Behavioral Neuroscience*, *102*(4), 471–480. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.102.4.471>
- Driscoll, I., Hamilton, D. A., Petropoulos, H., Yeo, R. A., Brooks, W. M., Baumgartner, R. N., & Sutherland, R. J. (2003). The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *13*(12), 1344–1351. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHG081>
- Driscoll, I., Howard, S. R., Stone, J. C., Monfils, M. H., Tomanek, B., Brooks, W. M., & Sutherland, R. J. (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*, *139*(4), 1173–1185. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2006.01.040>
- Duan, H., Wearne, S. L., Rocher, A. B., Macedo, A., Morrison, J. H., & Hof, P. R. (2003). Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cerebral Cortex*, *13*(9), 950–961. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/13.9.950>,
- Edler, M. C., Salek, A. B., Watkins, D. S., Kaur, H., Morris, C. W., Yamamoto, B. K., & Baucum, A. J. (2018). Mechanisms Regulating the Association of Protein Phosphatase 1 with Spinophilin and Neurabin. *ACS Chemical Neuroscience*, *9*(11), 2701–2712. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.8B00144>,
- Ekstrom, A. D., Kahana, M. J., Caplan, J. B., Fields, T. A., Isham, E. A., Newman, E. L., & Fried, I. (2003). Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature*, *425*(6954), 184–187. <https://doi.org/10.1038/NATURE01964>,
- El-Falougy, H., & Benuska, J. (2006). History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratislavské Lekárske Listy*, *107*(4), 103–106.
- Esparza-Leal, H., Martínez-Moreno, C. G., Ventura-Juárez, J., & Quintanar, J. L. (2022). Acetato de leuprolida, agonista de la GnRH, retrasa la neurodegeneración en un modelo experimental de glaucoma. *Ciencia y Tecnología Para La Salud Visual y Ocular*, *20*(2), e1491–e1491. <https://doi.org/10.19052/SV.VOL20.ISS2.4>
- Ettcheto, M., Busquets, O., Cano, A., Sánchez-Lopez, E., Manzine, P. R., Espinosa-Jimenez, T., Verdaguer, E., Sureda, F. X., Olloquequi, J., Castro-Torres, R. D.,

- Auladell, C., Folch, J., Casadesús, G., & Camins, A. (2021). Pharmacological Strategies to Improve Dendritic Spines in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 82(s1), S91–S107. <https://doi.org/10.3233/JAD-201106>
- Fauth, M., & Tetzlaff, C. (2016). Opposing Effects of Neuronal Activity on Structural Plasticity. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(JUNE), 75. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2016.00075>
- Feldman, H. H., Haas, M., Gandy, S., Schoepp, D. D., Cross, A. J., Mayeux, R., Sperling, R. A., Fillit, H., van de Hoef, D. L., Dougal, S., & Nye, J. S. (2014). Alzheimer's disease research and development: A call for a new research roadmap. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1313(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/NYAS.12424>,
- Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J. A., Zhuo, M., Allen, P. B., Ouimet, C. C., & Greengard, P. (2000). Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 9287–9292. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.16.9287>,
- Fink, H. A., Jutkowitz, E., McCarten, J. R., Hemmy, L. S., Butler, M., Davila, H., Ratner, E., Calvert, C., Barclay, T. R., Brasure, M., Nelson, V. A., & Kane, R. L. (2018). Pharmacologic interventions to prevent cognitive decline, mild cognitive impairment, and clinical Alzheimer-type dementia. *Annals of Internal Medicine*, 168(1), 39–51. <https://doi.org/10.7326/M17-1529>,
- Fjell, A. M., & Walhovd, K. B. (2010). Structural brain changes in aging: Courses, causes and cognitive consequences. *Reviews in the Neurosciences*, 21(3), 187–221. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2010.21.3.187>,
- Fogg, C., Griffiths, P., Meredith, P., & Bridges, J. (2018). Hospital outcomes of older people with cognitive impairment: An integrative review. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 33(9), 1177–1197. <https://doi.org/10.1002/GPS.4919>
- Foro Económico Mundial. (2014). *¿Es malo que una población esté disminuyendo?* <https://es.weforum.org/agenda/2014/08/es-necesariamente-malo-que-una-poblacion-este-disminuyendo/>
- Freire, M., García-López, P., & García-Marín, V. (2011). Dendritic Spines and Development: Towards a Unifying Model of Spinogenesis—A Present Day Review of Cajal's Histological Slides and Drawings. *Neural Plasticity*, 2010, 769207. <https://doi.org/10.1155/2010/769207>
- Fu, Y., Yu, Y., Paxinos, G., Watson, C., & Rusznák, Z. (2015). Aging-dependent changes in the cellular composition of the mouse brain and spinal cord.

Neuroscience, 290, 406–420.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.01.039>

- Fulop, T., Larbi, A., Witkowski, J. M., McElhaney, J., Loeb, M., Mitnitski, A., & Pawelec, G. (2010). Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology*, 11(5), 547–563. <https://doi.org/10.1007/S10522-010-9287-2>
- Funahashi, S., Bruce, C. J., & Goldman-Rakic, P. S. (1989). Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 61(2), 331–349. <https://doi.org/10.1152/JN.1989.61.2.331>,
- Galea, L. A. M. (2008). Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Research Reviews*, 57(2), 332–341. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2007.05.008>
- Gallagher, M., Burwell, R., & Burchinal, M. (2015). Severity of Spatial Learning Impairment in Aging: Development of a Learning Index for Performance in the Morris Water Maze. *Behavioral Neuroscience*, 129(4), 540. <https://doi.org/10.1037/BNE0000080>
- Gómez-Padilla, E., Bello-Medina, P. C., León-Jacinto, U., Orta-Salazar, E., Quirarte, G. L., Ramírez-Amaya, V., Prado-Alcalá, R. A., & Díaz-Cintra, S. (2020). Morris water maze overtraining increases the density of thorny excrescences in the basal dendrites of CA3 pyramidal neurons. *Behavioural Brain Research*, 379. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112373>
- González, K. D. (2015). *Envejecimiento demográfico en México: análisis comparativo entre las entidades federativas*. Consejo Nacional de Población (CONAPO).
- González-Torres, M. L., Calderón-Vallejo, D., & Quintanar, J. L. (2019). Chronic administration of gonadotropin releasing-hormone improves learning in old gonadectomized rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 157, 35–40. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2018.11.010>,
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260–265. <https://doi.org/10.1038/6365>,
- Gruenewald, D. A., Naai, M. A., Marck, B. T., & Matsumoto, A. M. (2000). Age-related decrease in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression, but not pituitary responsiveness to GnRH, in the male brown Norway rat. *Journal of Andrology*, 21(1), 72–84. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03278.x>
- Guzmán-Soto, I., Salinas, E., Hernández-Jasso, I., & Quintanar, J. L. (2012). Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves experimental autoimmune

encephalomyelitis: A possible therapy for multiple sclerosis. *Neurochemical Research*, 37(10), 2190–2197. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0842-x>

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), 801–806. <https://doi.org/10.1038/NATURE03721>,

Han, F., Luo, C., Lv, D., Tian, L., & Qu, C. (2022). Risk Factors Affecting Cognitive Impairment of the Elderly Aged 65 and Over: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.903794>,

Hao, J., Janssen, W. G. M., Tang, Y., Roberts, J. A., McKay, H., Lasley, B., Allen, P. B., Greengard, P., Rapp, P. R., Kordower, J. H., Hof, P. R., & Morrison, J. H. (2003). Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, 465(4), 540–550. <https://doi.org/10.1002/CNE.10837>,

Harada, A., Teng, J., Takei, Y., Oguchi, K., & Hirokawa, N. (2002). MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *The Journal of Cell Biology*, 158(3), 541. <https://doi.org/10.1083/JCB.200110134>

Harries, L. W., Hernandez, D., Henley, W., Wood, A. R., Holly, A. C., Bradley-Smith, R. M., Yaghooskar, H., Dutta, A., Murray, A., Frayling, T. M., Guralnik, J. M., Bandinelli, S., Singleton, A., Ferrucci, L., & Melzer, D. (2011). Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell*, 10(5), 868–878. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2011.00726.X>

Hendrickx, J. O., De Moudt, S., Calus, E., De Deyn, P. P., Van Dam, D., & De Meyer, G. R. Y. (2022). Age-related cognitive decline in spatial learning and memory of C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 418, 113649. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2021.113649>

Herbison, A. E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(8), 452–466. <https://doi.org/10.1038/NREND0.2016.70>,

Hernández-Jasso, I., Domínguez-del-Toro, E., Delgado-García, J. M., & Quintanar, J. L. (2020). Recovery of sciatic nerve with complete transection in rats treated with leuprolide acetate: A gonadotropin-releasing hormone agonist. *Neuroscience Letters*, 739. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2020.135439>

Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0804615>

- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(9), 647–658. <https://doi.org/10.1038/NRN2699>,
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*, *189*(4), 619–629. <https://doi.org/10.1083/JCB.201003008>,
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Kromer, L. J., & Damasio, A. R. (1986). Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, *20*(4), 472–481. <https://doi.org/10.1002/ANA.410200406>,
- Ijomone, O. M., & Biose, I. J. (2019). Effects of dextromethorphan on depressive- And cognitive-associated behaviors: A sexually dimorphic study. *Basic and Clinical Neuroscience*, *10*(4), 393–400. <https://doi.org/10.32598/bcn.9.10.275>
- INEGI. (2020). *Censo de Población y Vivienda 2020*. <https://www.inegi.org.mx/temas/estructural/>
- INEGI. (2023). *Natalidad y fecundidad*. Estadística de Nacimientos Registrados (ENR). <https://www.inegi.org.mx/temas/natalidad/>
- Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., & Genrikhs, E. E. (2019). Neurogenesis and brain aging. *Reviews in the Neurosciences*, *30*(6), 573–580. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2018-0084>
- Ishikawa, R., Katoh, K., Takahashi, A., Xie, C., Oseki, K., Watanabe, M., Igarashi, M., Nakamura, A., & Kohama, K. (2007). Drebrin attenuates the interaction between actin and myosin-V. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *359*(2), 398–401. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.05.123>
- Itokazu, N., Ikegaya, Y., Nishikawa, M., & Matsuki, N. (2000). Bidirectional actions of docosahexaenoic acid on hippocampal neurotransmissions in vivo. *Brain Research*, *862*(1–2), 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02129-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02129-6)
- Jack, C. R., Albert, M. S., Knopman, D. S., McKhann, G. M., Sperling, R. A., Carrillo, M. C., Thies, B., & Phelps, C. H. (2011). Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *7*(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2011.03.004>
- Jaskelioff, M., Muller, F. L., Paik, J. H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A. C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., Horner, J. W., Maratos-Flier, E., & Depinho, R. A. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, *469*(7328), 102–107. <https://doi.org/10.1038/NATURE09603>

- Jung, C. K. E., & Herms, J. (2014). Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: An in vivo imaging study. *Cerebral Cortex*, *24*(2), 377–384. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHS317>,
- Kabaso, D., Coskren, P. J., Henry, B. I., Hof, P. R., & Wearne, S. L. (2009). The electrotonic structure of pyramidal neurons contributing to prefrontal cortical circuits in macaque monkeys is significantly altered in aging. *Cerebral Cortex*, *19*(10), 2248–2268. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHN242>,
- Karges, B., Karges, W., & de Roux, N. (2003). Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. In *Human Reproduction Update* (Vol. 9, Issue 6, pp. 523–530). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg040>
- Kawles, A., Minogue, G., Zouridakis, A., Keszycki, R., Gill, N., Nassif, C., Coventry, C., Zhang, H., Rogalski, E., Flanagan, M. E., Castellani, R., Bigio, E. H., Mesulam, M. M., Geula, C., & Gefen, T. (2023). Differential vulnerability of the dentate gyrus to tauopathies in dementias. *Acta Neuropathologica Communications*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40478-022-01485-7/FIGURES/5>
- Kennedy, P. J., & Shapiro, M. L. (2004). Retrieving memories via internal context requires the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *24*(31), 6979–6985. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1388-04.2004>,
- Kessels, R. P. C., D'Alfonso, A. A. L., Postma, A., & De Haan, E. H. F. (2000). Spatial working memory performance after high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the left and right posterior parietal cortex in humans. *Neuroscience Letters*, *287*(1), 68–70. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01146-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01146-0)
- Kessels, R. P. C., De Haan, E. H. F., Kappelle, L. J., & Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: A meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews*, *35*(3), 295–303. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00058-3)
- Khanal, P., & Hotulainen, P. (2021). Dendritic spine initiation in brain development, learning and diseases and impact of bar-domain proteins. *Cells*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/CELLS10092392>,
- Kim, Y., Jang, Y. N., Kim, J. Y., Kim, N., Noh, S., Kim, H., Queenan, B. N., Bellmore, R., Mun, J. Y., Park, H., Rah, J. C., Pak, D. T. S., & Lee, K. J. (2020). Microtubule-associated protein 2 mediates induction of long-term potentiation in hippocampal neurons. *FASEB Journal*, *34*(5), 6965–6983. <https://doi.org/10.1096/FJ.201902122RR>,
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, *25*(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>

Knopman, D. S., DeKosky, S. T., Cummings, J. L., Chui, H., Corey-Bloom, J., Relkin, N., Small, G. W., Miller, B., & Stevens, J. C. (2001). Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review): Report of the quality standards subcommittee of the american academy of neurology. *Neurology*, *56*(9), 1143–1153. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.9.1143>,

Koga, H., Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Research Reviews*, *10*(2), 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.001>

Koleske, A. J. (2013). Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(8), 536–550. <https://doi.org/10.1038/NRN3486>,

Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods in Molecular Biology*, *1916*, 105–111. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10,

Lacreuse, A., Kim, C. B., Rosene, D. L., Killiany, R. J., Moss, M. B., Moore, T. L., Chennareddi, L., & Herndon, J. G. (2005). Sex, age, and training modulate spatial memory in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience*, *119*(1), 118–126. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.118>,

LaPlante, B. J., Powers, C. F., Gault, J. L., Reynolds, B. D., & Gregory, C. W. (2006). P4–353: Stabilization of cognitive decline in Alzheimer’s disease following treatment with leuprolide acetate. *Alzheimer’s & Dementia*, *2*(3S_Part_20). <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2006.05.2094>

Larson, E. B., Wang, L., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., Crane, P., & Kukull, W. (2006). Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Annals of Internal Medicine*, *144*(2), 73–81. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-2-200601170-00004>,

Laurine, E., Lafitte, D., Grégoire, C., Séréé, E., Loret, E., Douillard, S., Michel, B., Briand, C., & Verdier, J. M. (2003). Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(32), 29979–29986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303242200>

Leblanc, P., Crumeyrolle, M., Latouche, J., Jordan, D., Fillion, G., L’Heritier, A., Kordon, C., Dussailant, M., Rostène, W., & Haour, F. (1988). Characterization and Distribution of Receptors for Gonadotropin-Releasing Hormone in the Rat Hippocampus. *Neuroendocrinology*, *48*(5), 482–488. <https://doi.org/10.1159/000125053>

Leblanc, P., Crumeyrolle, M., Latouche, J., Jordan, D., Fillion, G., L’Heritier, A., Kordon, C., Dussailant, M., Rostene, W., & Haour, F. (1988). Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat

hippocampus. *Neuroendocrinology*, 48(5), 482–488.
<https://doi.org/10.1159/000125053>,

Légaré, J. (2015). Population Aging: Economic and Social Consequences. *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences: Second Edition*, 540–544. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.34041-7>

León, I., Tascón, L., & Cimadevilla, J. M. (2016). Age and gender-related differences in a spatial memory task in humans. *Behavioural Brain Research*, 306, 8–12. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2016.03.008>,

Lester, A. W., Moffat, S. D., Wiener, J. M., Barnes, C. A., & Wolbers, T. (2017). The Aging Navigational System. *Neuron*, 95(5), 1019–1035. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.037>

Leuner, B., & Shors, T. J. (2004). New Spines, New Memories. *Molecular Neurobiology*, 29(2), 117. <https://doi.org/10.1385/MN:29:2:117>

Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(6), 738–746. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.10.002>

Li, A. W. Y., & King, J. (2019). Spatial memory and navigation in ageing: A systematic review of MRI and fMRI studies in healthy participants. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 103, 33–49. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2019.05.005>,

Li, G., Peskind, E. R., Millard, S. P., Chi, P., Sokal, I., Yu, C. E., Bekris, L. M., Raskind, M. A., Galasko, D. R., & Montine, T. J. (2009). Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005424>,

Li, J. M., Yang, F. H., Chao, M. W., & Tseng, C. Y. (2022). Swimming exercise prevents hippocampal dendritic spine changes and memory loss caused by aging: An application of a new semi-automated spine analysis software. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103755>

Li, Z., Zhang, Z., Ren, Y., Wang, Y., Fang, J., Yue, H., Ma, S., & Guan, F. (2021). Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology*, 22(2), 165–187. <https://doi.org/10.1007/S10522-021-09910-5>

Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L., & Gage, F. H. (2004). Neurogenesis in the Adult Brain: New Strategies for Central Nervous System Diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 399–421. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.44.101802.121631>,

- Lim, S. Y., & Suzuki, H. (2001). Changes in maze behavior of mice occur after sufficient accumulation of docosahexaenoic acid in brain. *Journal of Nutrition*, 131(2), 319–324. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.319>
- Limonta, P., Marelli, M. M., Mai, S., Motta, M., Martini, L., & Moretti, R. M. (2012). GnRH receptors in cancer: From cell biology to novel targeted therapeutic strategies. In *Endocrine Reviews* (Vol. 33, Issue 5, pp. 784–811). Endocr Rev. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1014>
- Lin, W.-H., & Webb, D. J. (2009). Actin and Actin-Binding Proteins: Masters of Dendritic Spine Formation, Morphology, and Function. *The Open Neuroscience Journal*, 3(2), 54–66. <https://doi.org/10.2174/1874082000903020054>
- Lodato, M. A., Rodin, R. E., Bohrson, C. L., Coulter, M. E., Barton, A. R., Kwon, M., Sherman, M. A., Vitzthum, C. M., Luquette, L. J., Yandava, C. N., Yang, P., Chittenden, T. W., Hatem, N. E., Ryu, S. C., Woodworth, M. B., Park, P. J., & Walsh, C. A. (2018). Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science*, 359(6375), 555–559. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO4426>,
- Long, L. H., Liu, R. L., Wang, F., Liu, J., Hu, Z. L., Xie, N., Jin, Y., Fu, H., & Chen, J. G. (2009). Age-related synaptic changes in the ca1 stratum radiatum and spatial learning impairment in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36(7), 675–681. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1681.2008.05132.X>,
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., & Yankner, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429(6994), 883–891. <https://doi.org/10.1038/NATURE02661>,
- Luine, V. N., Wallace, M. E., & Frankfurt, M. (2011). Age-related deficits in spatial memory and hippocampal spines in virgin, female fischer 344 rats. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/316386>,
- Ma, S., & Zuo, Y. (2022). Synaptic modifications in learning and memory – A dendritic spine story. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 125, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.05.015>
- Maggi, R. (2016). Physiology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) : Beyond the Control of Reproductive Functions. *MOJ Anatomy & Physiology*, 2(5), 63. <https://doi.org/10.15406/MOJAP.2016.02.00063>
- Maggi, R., Cariboni, A. M., Marelli, M. M., Moretti, R. M., Andrè, V., Marzagalli, M., & Limonta, P. (2016). GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human Reproduction Update*, 22(3), 358–381. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv059>

- Mahmmoud, R. R., Sase, S., Aher, Y. D., Sase, A., Gröger, M., Mokhtar, M., Höger, H., & Lubec, G. (2015). Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines. *PLOS ONE*, *10*(10), e0139739. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0139739>
- Maille, A., & Schradin, C. (2016). Survival is linked with reaction time and spatial memory in African striped mice. *Biology Letters*, *12*(8). <https://doi.org/10.1098/RSBL.2016.0346>
- Maita, K., Matsunuma, N., Masuda, H., & Suzuki, Y. (1979). The age-related tumor incidence in Wistar-Imamichi rat. *Experimental Animals*, *28*(4), 555–560. https://doi.org/10.1538/EXPANIM1978.28.4_555,
- Manfredi-Lozano, M., Leysen, V., Adamo, M., Paiva, I., Rovera, R., Pignat, J. M., Timzoura, F. E., Candlish, M., Eddarkaoui, S., Malone, S. A., Silva, M. S. B., Trova, S., Imbernon, M., Decoster, L., Cotellessa, L., Tena-Sempere, M., Claret, M., Paoloni-Giacobino, A., Plassard, D., ... Prevot, V. (2022). GnRH replacement rescues cognition in Down syndrome. *Science*, *377*(6610). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABQ4515>,
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, *23*, 649–711. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.23.1.649>,
- Martínez-Moreno, C. G., Calderón-Vallejo, D., Díaz-Galindo, C., Hernández-Jasso, I., Olivares-Hernández, J. D., Ávila-Mendoza, J., Epardo, D., Balderas-Márquez, J. E., Urban-Sosa, V. A., Baltazar-Lara, R., Carranza, M., Luna, M., Arámburo, C., & Quintanar, J. L. (2024). Neurotrophic and synaptic effects of GnRH and/or GH upon motor function after spinal cord injury in rats. *Scientific Reports*, *14*(1), 26420. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-78073-3>;SUBJMETA=1687,1825,2597,2599,378,631;KWRD=SPINAL+CORD+INJURY,SPINE+PLASTICITY
- Martini, H., & Passos, J. F. (2023). Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. *The FEBS Journal*, *290*(5), 1186–1202. <https://doi.org/10.1111/FEBS.16361>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, *7*(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2011.03.005>,

- Meethal, S. V., Smith, M. A., Bowen, R. L., & Atwood, C. S. (2005). The gonadotropin connection in Alzheimer's disease. *Endocrine*, 26(3), 317–325. <https://doi.org/10.1385/ENDO:26:3:317>
- Millar, R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, 88(1–2), 5–28. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.05.032>
- Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K., & Maudsley, S. R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. In *Endocrine Reviews* (Vol. 25, Issue 2, pp. 235–275). Endocr Rev. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0002>
- Millar, R. P., & Newton, C. L. (2010). The year in G protein-coupled receptor research. *Molecular Endocrinology*, 24(1), 261–274. <https://doi.org/10.1210/ME.2009-0473>,
- Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Ishizuka, Y., Takahashi, H., Kojima, N., Kojima, M., & Shirao, T. (2014). Myosin II ATPase activity mediates the long-term potentiation-induced exodus of stable F-actin bound by drebrin a from dendritic spines. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0085367>,
- Moffat, S. D., Zonderman, A. B., & Resnick, S. M. (2001). Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task. *Neurobiology of Aging*, 22(5), 787–796. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00251-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00251-2)
- Montine, T. J., Bukhari, S. A., & White, L. R. (2021). Cognitive Impairment in Older Adults and Therapeutic Strategies. *Pharmacological Reviews*, 73(1), 152–162. <https://doi.org/10.1124/PHARMREV.120.000031>
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Wilson, R. S., Aggarwal, N., & Schneider, J. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 60(7), 940–946. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.60.7.940>,
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681A0>,
- Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: Hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 240–250. <https://doi.org/10.1038/NRN3200>,
- Moskalev, A. A., Shaposhnikov, M. V., Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., & Fraifeld, V. E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*, 12(2), 661–684. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2012.02.001>

- Muly, C. C., Allen, P., Mazloom, M., Aranbayeva, Z., Greenfield, A. T., & Greengard, P. (2004). Subcellular distribution of neurabin immunolabeling in primate prefrontal cortex: Comparison with spinophilin. *Cerebral Cortex*, *14*(12), 1398–1407. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHH101>,
- Mylonas, A., & O’Loughlen, A. (2022). Cellular Senescence and Ageing: Mechanisms and Interventions. *Frontiers in Aging*, *3*. <https://doi.org/10.3389/FRAGI.2022.866718>
- Naor, Z. (2009). Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *30*(1), 10–29. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2008.07.001>
- Nelson, A. P., & O’Connor, M. G. (2008). Mild cognitive impairment: A neuropsychological perspective. *CNS Spectrums*, *13*(1), 56–64. <https://doi.org/10.1017/S1092852900016163>,
- Ngwenya, L. B., Heyworth, N. C., Shwe, Y., Moore, T. L., & Rosene, D. L. (2015). Age-related changes in dentate gyrus cell numbers, neurogenesis, and associations with cognitive impairments in the rhesus monkey. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *9*(July). <https://doi.org/10.3389/FNSYS.2015.00102>,
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, *64*, 313–353. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYSIOL.64.081501.160008>,
- O’Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1),
- Oliveira-Santos, L. G. R., Forester, J. D., Piovezan, U., Tomas, W. M., & Fernandez, F. A. S. (2016). Incorporating animal spatial memory in step selection functions. *Journal of Animal Ecology*, *85*(2), 516–524. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12485>,
- Onozato, T., Tamura, T., Nagasawa, T., Hayashi, M., Okuhara, Y., & Kuroda, J. (2012). Spontaneous Subcutaneous Sarcoma in a 50-week-old Male Wistar Hannover GALAS Rat. *Journal of Toxicologic Pathology*, *24*(4), 239. <https://doi.org/10.1293/TOX.24.239>
- Othman, M. Z., Hassan, Z., & Has, A. T. C. (2022). Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Experimental Animals*, *71*(3), 264–280. <https://doi.org/10.1538/EXPANIM.21-0120>,
- Ottis, P., Topic, B., Loos, M., Li, K. W., de Souza, A., Schulz, D., Smit, A. B., Huston, J. P., & Korth, C. (2013). Aging-Induced Proteostatic Changes in the Rat Hippocampus Identify ARP3, NEB2 and BRAG2 as a Molecular Circuitry for

Cognitive Impairment. *PLoS ONE*, 8(9).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0075112>,

Quimet, C. C., Katona, I., Allen, P., Freund, T. F., & Greengard, P. (2004). Cellular and subcellular distribution of spinophilin, a PP1 regulatory protein that bundles F-actin in dendritic spines. *Journal of Comparative Neurology*, 479(4), 374–388. <https://doi.org/10.1002/CNE.20313>,

Page, T. L., Einstein, M., Duan, H., He, Y., Flores, T., Rolshud, D., Erwin, J. M., Wearne, S. L., Morrison, J. H., & Hof, P. R. (2002). Morphological alterations in neurons forming corticocortical projections in the neocortex of aged Patas monkeys. *Neuroscience Letters*, 317(1), 37–41. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02428-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02428-4)

Palacios, J. L., Luquin, S., Quintanar, J. L., & Munoz, A. (2022). Continuous administration of leuprolide acetate improves urinary function in male rats with severe thoracic spinal cord injury. *Life Sciences*, 310. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.121113>

Papasozomenos Ch., S., & Binder, L. I. (1986). Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is present in astrocytes of the optic nerve but absent from astrocytes of the optic tract. *Journal of Neuroscience*, 6(6), 1748–1756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-06-01748.1986>,

Park, S. A., Hahn, J. H., Kim, J. I., Na, D. L., & Huh, K. (2000). Memory deficits after bilateral anterior fornix infarction. *Neurology*, 54(6), 1379–1382. <https://doi.org/10.1212/WNL.54.6.1379>,

Paxinos, George., & Watson, Charles. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*.

Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 31. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2020.00031>

Peng, T. C., Chen, W. L., Wu, L. W., Chang, Y. W., & Kao, T. W. (2020). Sarcopenia and cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 39(9), 2695–2701. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.12.014>

Periti, P., Mazzei, T., & Mini, E. (2002). Clinical pharmacokinetics of depot leuprorelin. *Clinical Pharmacokinetics*, 41(7), 485–504. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241070-00003>,

Perrochon, A., Mandigout, S., Petruzzellis, S., Soria Garcia, N., Zaoui, M., Berthoz, A., & Daviet, J. C. (2018). The influence of age in women in visuo-spatial memory in reaching and navigation tasks with and without landmarks. *Neuroscience Letters*, 684, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.054>

- Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, 127(4), 321–355. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001270402>,
- Pinnock, S. B., & Herbert, J. (2008). Brain-derived neurotropic factor and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus: interactions with corticosterone. *The European Journal of Neuroscience*, 27(10), 2493. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2008.06250.X>
- Poreh, A., Winocur, G., Moscovitch, M., Backon, M., Goshen, E., Ram, Z., & Feldman, Z. (2006). Anterograde and retrograde amnesia in a person with bilateral fornix lesions following removal of a colloid cyst. *Neuropsychologia*, 44(12), 2241–2248. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.05.020>
- Postu, P. A., Sadiki, F. Z., El Idrissi, M., Cioanca, O., Trifan, A., Hancianu, M., & Hritcu, L. (2019). Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108673>
- Prange-Kiel, J., Jarry, H., Schoen, M., Kohlmann, P., Lohse, C., Zhou, L., & Rune, G. M. (2008). Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Cell Biology*, 180(2), 417–426. <https://doi.org/10.1083/JCB.200707043>,
- Preston, A. R., & Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current Biology*, 23(17). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.041>
- Quintanar, J. L., Calderón-Vallejo, D., & Hernández-Jasso, I. (2016). Effects of GnRH on Neurite Outgrowth, Neurofilament and Spinophilin Proteins Expression in Cultured Spinal Cord Neurons of Rat Embryos. *Neurochemical Research*, 41(10), 2693–2698. <https://doi.org/10.1007/S11064-016-1983-0>,
- Quintanar, J. L., & Salinas, E. (2008). Neurotrophic effects of GnRH on neurite outgrowth and neurofilament protein expression in cultured cerebral cortical neurons of rat embryos. *Neurochemical Research*, 33(6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9549-9>
- Quintanar, J. L., Salinas, E., & González, R. (2007). Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in cerebral cortical neurons of embryos and adult rats. *Neuroscience Letters*, 411(1), 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.077>
- Quintanar, J. L., Salinas, E., & González, R. (2009). Gonadotropin-releasing hormone receptor in spinal cord neurons of embryos and adult rats.

Neuroscience Letters, 461(1), 21–24.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.028>

- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 353(6301), 777–783. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAG2590>,
- Ravaglia, G., Forti, P., Lucicesare, A., Pisacane, N., Rietti, E., Bianchin, M., & Dalmonte, E. (2008). Physical activity and dementia risk in the elderly: Findings from a prospective Italian study. *Neurology*, 70(19 PART 2), 1786–1794. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000296276.50595.86>,
- Robinson, J. L., Molina-Porcel, L., Corrada, M. M., Raible, K., Lee, E. B., Lee, V. M. Y., Kawas, C. H., & Trojanowski, J. Q. (2014). Perforant path synaptic loss correlates with cognitive impairment and Alzheimer's disease in the oldest-old. *Brain*, 137(9), 2578–2587. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWU190>,
- Rosales-Reynoso, M. A., Ochoa-Hernández, A. B., Juárez-Vázquez, C. I., & Barros-Núñez, P. (2016). Mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la memoria y su implicación en algunas enfermedades neurológicas. *Neurología*, 31(9), 628–638. <https://doi.org/10.1016/J.NRL.2014.02.004>
- Rosenzweig, E. S., & Barnes, C. A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology*, 69(3), 143–179. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00126-0)
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., & Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466–470. <https://doi.org/10.1038/NATURE09817>,
- Sánchez, C., Díaz-Nido, J., & Avila, J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*, 61(2), 133–168. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00046-5)
- Sarrouilhe, D., di Tommaso, A., Métayé, T., & Ladeveze, V. (2006). Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie*, 88(9), 1099–1113. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.04.010>
- Scharre, D. W., & Trzepacz, P. T. (2013). Evaluation of Cognitive Impairment in Older Adults. <https://doi.org/10.1176/Appi.Focus.11.4.482>, 11(4), 482–500. <https://doi.org/10.1176/APPI.FOCUS.11.4.482>
- Schausberger, P., & Peneder, S. (2017). Non-associative versus associative learning by foraging predatory mites. *BMC Ecology*, 17(1), 2. <https://doi.org/10.1186/S12898-016-0112-X>

- Schoenfeld, T. J., & Gould, E. (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology*, 233(1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.008>
- Scott, A. J., Ellison, M., & Sinclair, D. A. (2021). The economic value of targeting aging. *Nature Aging 2021 1:7*, 1(7), 616–623. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00080-0>
- Seidler, R. D., Bernard, J. A., Burutolu, T. B., Fling, B. W., Gordon, M. T., Gwin, J. T., Kwak, Y., & Lipps, D. B. (2010). Motor control and aging: Links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(5), 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.10.005>
- Seri, B., & Alvarez-Buylla, A. (2002). Neural stem cells and the regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Clinical Neuroscience Research*, 2(1–2), 11. [https://doi.org/10.1016/S1566-2772\(02\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S1566-2772(02)00004-X)
- Shukitt-Hale, B., McEwen, J. J., Szprengiel, A., & Joseph, J. A. (2004). Effect of age on the radial arm water maze - A test of spatial learning and memory. *Neurobiology of Aging*, 25(2), 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00041-1)
- Sloan, H. L., Good, M., & Dunnett, S. B. (2006). Double dissociation between hippocampal and prefrontal lesions on an operant delayed matching task and a water maze reference memory task. *Behavioural Brain Research*, 171(1), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.030>
- Smith, D. E., Rapp, P. R., McKay, H. M., Roberts, J. A., & Tuszynski, M. H. (2004). Memory Impairment in Aged Primates Is Associated with Focal Death of Cortical Neurons and Atrophy of Subcortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4373–4381. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4289-03.2004>,
- Smith, F. D., Oxford, G. S., & Milgram, S. L. (1999). Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19894–19900. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19894>
- Solstad, T., Boccara, C. N., Kropff, E., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2008). Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science*, 322(5909), 1865–1868. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1166466>,
- Sonar, S. A., Uhrlaub, J. L., Coplen, C. P., Sempowski, G. D., Dudakov, J. A., Van den Brink, M. R. M., LaFleur, B. J., Jergovic, M., & Nikolich-Zugich, J. (2022). Early age-related atrophy of cutaneous lymph nodes precipitates an early functional decline in skin immunity in mice with aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(17),

e2121028119.
/DCSUPPLEMENTAL

[https://doi.org/10.1073/PNAS.2121028119/-](https://doi.org/10.1073/PNAS.2121028119/)

- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack, C. R., Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M., Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., ... Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 7(3), 280–292. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2011.03.003>,
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 279–306. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.27.070203.144130>,
- Stranahan, A. M., Khalil, D., & Gould, E. (2007). Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*, 17(11), 1017–1022. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20348>,
- Sudhakaran, I. P., & Ramaswami, M. (2017). Long-term memory consolidation: The role of RNA-binding proteins with prion-like domains. *RNA Biology*, 14(5), 568–586. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1244588>,
- Sugar, J., & Moser, M. B. (2019). Episodic memory: Neuronal codes for what, where, and when. *Hippocampus*, 29(12), 1190–1205. <https://doi.org/10.1002/HIPO.23132>,
- Szymanska, H., Lechowska-Piskorowska, J., Krysiak, E., Strzalkowska, A., Unrug-Bielawska, K., Grygalewicz, B., Skurzak, H. M., Pienkowska-Grela, B., & Gajewska, M. (2014). Neoplastic and Nonneoplastic Lesions in Aging Mice of Unique and Common Inbred Strains Contribution to Modeling of Human Neoplastic Diseases. *Veterinary Pathology*, 51(3), 663–679. <https://doi.org/10.1177/0300985813501334>,
- Tadic, M., Cuspidi, C., & Hering, D. (2016). Hypertension and cognitive dysfunction in elderly: Blood pressure management for this global burden. *BMC Cardiovascular Disorders*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12872-016-0386-0>,
- Tan, J. K., Nazar, F. H., Makpol, S., & Teoh, S. L. (2022). Zebrafish: A Pharmacological Model for Learning and Memory Research. *Molecules*, 27(21). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217374>,

- Tanila, H., Shapiro, M., Gallagher, M., & Eichenbaum, H. (1997). Brain aging: Changes in the nature of information coding by the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *17*(13), 5155–5166. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-13-05155.1997>
- Taylor, R. C., & Dillin, A. (2011). Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(5), 1–17. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004440>,
- Tenchov, R., Sasso, J. M., Wang, X., & Zhou, Q. A. (2024). Aging Hallmarks and Progression and Age-Related Diseases: A Landscape View of Research Advancement. *ACS Chemical Neuroscience*, *15*(1), 1–30. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.3C00531>
- Terry-Lorenzo, R. T., Roadcap, D. W., Otsuka, T., Blanpied, T. A., Zamorano, P. L., Garner, C. C., Shenolikar, S., & Ehlers, M. D. (2005). Neurabin/protein phosphatase-1 complex regulates dendritic spine morphogenesis and maturation. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(5), 2349–2362. <https://doi.org/10.1091/MBC.E04-12-1054>,
- Thibault, O., Hadley, R., & Landfield, P. W. (2001). Elevated postsynaptic [CA2+]i and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: Relationship to impaired synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, *21*(24), 9744–9756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09744.2001>,
- Toda, T., Parylak, S. L., Linker, S. B., & Gage, F. H. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Molecular Psychiatry*, *24*(1), 67–87. <https://doi.org/10.1038/S41380-018-0036-2>,
- Tonegawa, S., Morrissey, M. D., & Kitamura, T. (2018). The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature Reviews Neuroscience* *2018* *19*:8, *19*(8), 485–498. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0031-2>
- Troen, B. R. (2003). The biology of aging. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, *70*(1), 3–22.
- Tsukada, H., Kakiuchi, T., Fukumoto, D., Nishiyama, S., & Koga, K. (2000). Docosahexaenoic acid (DHA) improves the age-related impairment of the coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response: A PET study in conscious monkeys. *Brain Research*, *862*(1–2), 180–186. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02115-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02115-6)
- Tsukada, M., Prokscha, A., Oldekamp, J., & Eichele, G. (2003). Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mechanisms of Development*, *120*(9), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00177-1)

- Turrigiano, G. (2011). Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annual Review of Neuroscience*, *34*, 89–103. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-060909-153238>,
- Tuttle, C. S. L., Waaijer, M. E. C., Slee-Valentijn, M. S., Stijnen, T., Westendorp, R., & Maier, A. B. (2020). Cellular senescence and chronological age in various human tissues: A systematic review and meta-analysis. *Aging Cell*, *19*(2). <https://doi.org/10.1111/ACEL.13083>,
- Van Praag, H., Schinder, A. F., Christle, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, *415*(6875), 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030A>,
- Van Veluw, S. J., Sawyer, E. K., Clover, L., Cousijn, H., De Jager, C., Esiri, M. M., & Chance, S. A. (2012). Prefrontal cortex cytoarchitecture in normal aging and Alzheimer's disease: A relationship with IQ. *Brain Structure and Function*, *217*(4), 797–808. <https://doi.org/10.1007/S00429-012-0381-X>,
- Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G. C., Bielas, J. H., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A., & Loeb, L. A. (2008). DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nature Genetics*, *40*(4), 392–394. <https://doi.org/10.1038/NG.95>
- Vickers, J. C., Riederer, B. M., Marugg, R. A., Buée-Scherrer, V., Buée, L., Delacourte, A., & Morrison, J. H. (1994). Alterations in neurofilament protein immunoreactivity in human hippocampal neurons related to normal aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *62*(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90310-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90310-7)
- Viña, J., Borrás, C., & Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life*, *59*, 249–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15216540601178067>
- von Bernhardt, R., Eugenín-Von Bernhardt, L., & Eugenín, J. (2017). What is neural plasticity? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1015*, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_1,
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR Journal*, *55*(2), 310–332. <https://doi.org/10.1093/ILAR/ILU013>,
- Vouyiouklis, D. A., & Brophy, P. J. (1995). Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: Transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors. *Journal of Neuroscience Research*, *42*(6), 803–817. <https://doi.org/10.1002/JNR.490420609>,
- Wan, L., Huang, R. J., Luo, Z. H., Gong, J. E., Pan, A., Manavis, J., Yan, X. X., & Xiao, B. (2021). Reproduction-Associated Hormones and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neural Plasticity*, *2021*, 3651735. <https://doi.org/10.1155/2021/3651735>

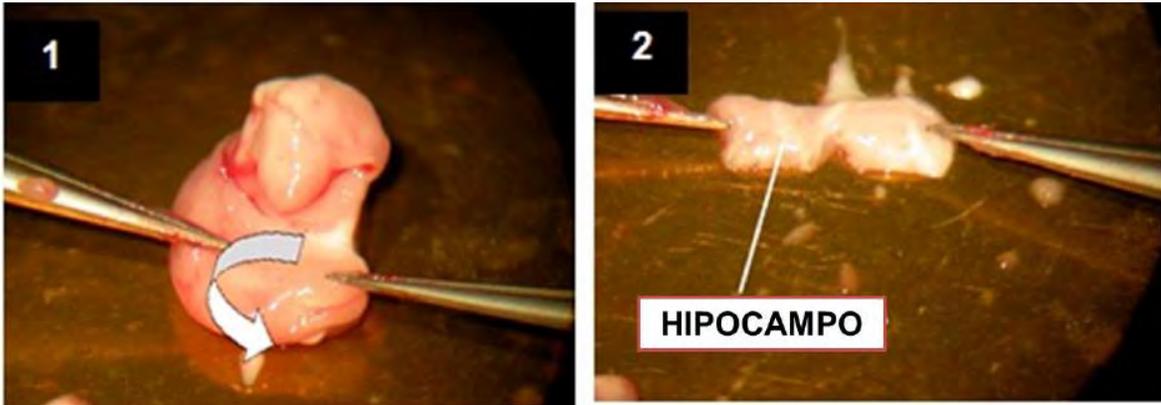
- Wang, C., Lee, H., Rao, G., & Knierim, J. J. (2024). Multiplexing of temporal and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2024.01.31.578307>
- Wang, L., Chadwick, W., Park, S.-S., Zhou, Y., Silver, N., Martin, B., & Maudsley, S. (2010). Gonadotropin-releasing hormone receptor system: modulatory role in aging and neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 9(5), 651. <https://doi.org/10.2174/187152710793361559>
- Warner, T. A., & Drugan, R. C. (2012). Morris water maze performance deficit produced by intermittent swim stress is partially mediated by norepinephrine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 101(1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.11.009>
- Wilson, A. C., Meethal, S. V., Bowen, R. L., & Atwood, C. S. (2007). Leuprolide acetate: A drug of diverse clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(11), 1851–1863. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.11.1851>
- Wilson, I. A., Ikonen, S., Gallagher, M., Eichenbaum, H., & Tanila, H. (2005). Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. *Journal of Neuroscience*, 25(29), 6877–6886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1744-05.2005>,
- Winocur, G., Moscovitch, M., Fogel, S., Rosenbaum, R. S., & Sekeres, M. (2005). Preserved spatial memory after hippocampal lesions: Effects of extensive experience in a complex environment. *Nature Neuroscience*, 8(3), 273–275. <https://doi.org/10.1038/NN1401>,
- Wissler Gerdes, E. O., Zhu, Y., Weigand, B. M., Tripathi, U., Burns, T. C., Tchkonja, T., & Kirkland, J. L. (2020). Cellular senescence in aging and age-related diseases: Implications for neurodegenerative diseases. *International Review of Neurobiology*, 155, 203–234. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2020.03.019>
- Wu, A., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 21(10), 1457–1467. <https://doi.org/10.1089/NEU.2004.21.1457>,
- Yasukawa, K., Sawamura, D., Sugawara, H., & Kato, N. (2005). Leuprorelin acetate granulomas: Case reports and review of the literature. *British Journal of Dermatology*, 152(5), 1045–1047. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2133.2005.06341.X>,
- Yuste, R. (2013). Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*, 36(Volume 36, 2013), 429–449. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-062111-150455/CITE/REFWORKS>

- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1071–1089. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.24.1.1071>,
- Zhang, C., & Cuervo, A. M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature Medicine*, 14(9), 959–965. <https://doi.org/10.1038/NM.1851>,
- Zhao, Y., Arceneaux, L., Culicchia, F., & Lukiw, W. J. (2021). Neurofilament Light (NF-L) Chain Protein from a Highly Polymerized Structural Component of the Neuronal Cytoskeleton to a Neurodegenerative Disease Biomarker in the Periphery. *Journal of Alzheimer's & Neurodegenerative Diseases*, 7(2), 1–9. <https://doi.org/10.24966/AND-9608/100056>



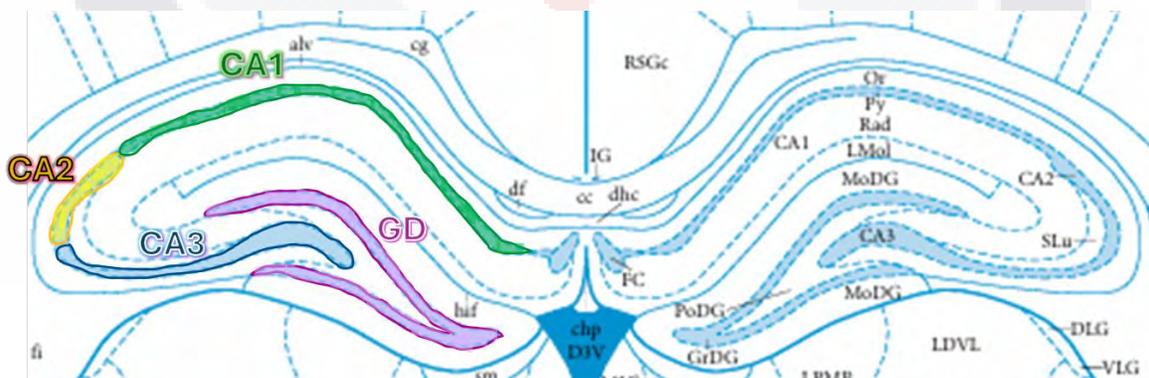
11. ANEXOS

- ANEXO 1. DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO



A1. Disección del hipocampo (Chiu et al., 2007). Para aislar el hipocampo, primero se levantó el lado ventral del cerebro y posterior a ello el cerebro medio fue retirado para exponerlo. Finalmente se diseccionó el hipocampo de la corteza.

- ANEXO 2. CAPAS NEURONALES DEL HIPOCAMPO



A2. Capas neuronales del hipocampo (Paxinos & Watson, 2005). Se señala en código de colores cómo fueron delimitadas las capas neuronales del hipocampo para el análisis histológico, de acuerdo a la información de Paxinos & Watson en las coordenadas de los cortes analizados.