

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLÓGICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO ANIMAL

**“COLOCALIZACIÓN SINÁPTICA DE PSD95 Y SINAPSINA-1 EN EL HIPOCAMPO DE
RATAS HEMBRA *SPRAGUE DAWLEY* BAJO UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO
ACELERADO Y EVALUACIÓN DE TRASTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS”**

Por:

RODRIGO M. CASTRO G.
8-918-1002

Trabajo de graduación presentado a la
Escuela de Biología para optar por el
título de Licenciado en Biología con
orientación en Fisiología y
Comportamiento Animal

Panamá, República de Panamá
2024

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLÓGICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y COMPORTAMIENTO ANIMAL

**“COLOCALIZACIÓN SINÁPTICA DE PSD95 Y SINAPSINA-1 EN EL HIPOCAMPO DE
RATAS HEMBRA SPRAGUE DAWLEY BAJO UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO
ACELERADO Y EVALUACIÓN DE TRASTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS”**

Asesores

José P. Young C., PhD
Gloria Montenegro Msc.
Sara Vásquez Msc.

Estudiante

Rodrigo M. Castro G.

Co-asesores

María B. Carreira F., PhD
Kevin G. Mata A., Msc



DEDICATORIA



A mi madre y a mi hermana que han sido pilares fundamentales en mi desarrollo personal y académico. Su apoyo ha sido un lazo inquebrantable de amor incondicional. Me han visto crecer en cada etapa de mi vida y han respaldado cada decisión que he tomado con razón y determinación. Sin ellas, este trabajo que están por leer no habría sido posible.

Les agradezco profundamente por su apoyo, tanto emocional como económico, por sus consejos, por ser mis guías y por creer en mí incluso en los momentos en que yo dudaba. Gracias por confiar en mis capacidades y por alentarme siempre a dar lo mejor de mí en el camino de la ciencia.

Cada año que pasé en la universidad estuvo marcado por aprendizaje, experiencias y crecimiento, y en cada uno de esos momentos su amor y respaldo fueron mi mayor fortaleza. A mi madre, María Paulina, y a mi hermana, Génesis Castro, gracias por su constancia, por verme siempre como un estudiante excepcional y por ser mi mayor inspiración. A Christopher, que, aunque aún no sabe leer, espero que este proyecto le sea de grande inspiración para su vida. Este trabajo de grado ha sido el mayor desafío de mi vida, un proceso que me hizo crecer y cuyo fruto final está aquí, reflejado en estas páginas.

Los amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, la Santísima Trinidad y la Virgen María: Gracias por darme la fuerza, la resistencia, la inteligencia y la constancia para culminar este camino. Por ser mi guía en cada ensayo, en cada análisis, y por brindarme la sabiduría para afrontar los desafíos que se presentaron. La investigación es un proceso en constante movimiento, y su luz me ha permitido avanzar con determinación.

A la Universidad de Panamá: Gracias por tantos años de enseñanza y aprendizaje en los caminos de la biología. A mis mentores, José Young, Gloria Montenegro y Sara Vásquez por brindarme el apoyo, los consejos y las correcciones que esta tesis necesitó para poder ser completada.

A la Fundación DEVAUX: Su apoyo económico fue crucial para cubrir gastos de transporte, alimentación y conectividad, facilitando la culminación de este proyecto. Gracias por la oportunidad y por la confianza depositada en mí.

A INDICASAT-AIP: Gracias por proporcionarme un entorno de investigación óptimo, con instalaciones de primer nivel que facilitaron el desarrollo de este trabajo.

Al Centro de Neurociencias: Agradecido por ser parte de este laboratorio, fue un reto y un honor. La rigurosidad, la disciplina y la pasión con la que se trabaja allí me hicieron crecer enormemente. Cada ensayo, revisión de literatura y discusión científica me hicieron sentir parte de un programa de doctorado, promoviendo el pensamiento crítico y la resolución de problemas.

A Kevin Mata: Su capacidad docente y conocimientos en bioquímica han sido fundamentales en mi aprendizaje. Gracias por enseñarme a investigar, por su paciencia infinita y por expandir mis horizontes científicos. Trabajar con Kevin fue como colaborar con un PhD; su exigencia y compromiso hicieron de esta experiencia un verdadero reto y una enorme oportunidad de crecimiento.

A Julio Flores: Por su disposición a ayudar y por ampliar mis perspectivas sobre lo que implica un doctorado. Su trayectoria es una inspiración, y sus consejos fueron un faro en mi formación.

A la Dra. Rosa de Jesús: Su enseñanza en ética con animales y su pasión por la ciencia han dejado una huella imborrable en mí. Su compromiso y amor por la investigación con animales de experimentación me han inspirado a trabajar con la misma entrega y entusiasmo.

A la Dra. María Carreira: Por aceptarme en su grupo de investigación, por su escucha atenta y por permitir la discusión de nuevas ideas basadas en evidencia científica. Su creatividad y meticulosidad han sido un referente para mí.

Al personal del Bioterio: Alana, Sr. René y Lisi, gracias por sus enseñanzas, su disciplina y su paciencia en la transmisión de conocimientos fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A mis colegas de NeuroBasics: Ruth, Carlos y Janam, por compartir momentos clave en este proyecto. A Carlos, por brindarme confianza en mí mismo; a Janam, por su compromiso con la investigación en salud mental; y a Ruth, cuya sonrisa es una fuente de motivación y cuya dedicación y puntualidad fueron invaluable en los ensayos de conducta.

A AFIAMUP y a Diego Espino: Su curso de neuroanatomía fue un reto inmenso que me preparó con una base sólida en esta disciplina. Sus enseñanzas fueron fundamentales en mi formación.

A Paola Herrera: Desde una realidad virtual, su contenido en redes sociales ha impactado mi forma de pensar y me ha motivado a replantearme mi propósito de vida. Sus ideas fueron una inspiración en los momentos más difíciles.

A Bernardino Denis: Gracias por prestarme su anticuerpo secundario, el último eslabón experimental que permitió concluir esta tesis.

Al equipo del área de Microscopía: Dilan Moreno, Armando Castillo y Carolina Alvarado, su apoyo y disposición fueron esenciales en la fase final del proyecto.

A Alexandra Chen, por enseñarme a escribir esta tesis con agilidad y demostrarme que la mentalidad lo es todo a la hora de aterrizar un proyecto,

Cada persona mencionada aquí ha dejado una marca en mi camino. Esta tesis es también suya. Gracias por ser parte de esta travesía.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN	11
MARCO TEÓRICO	13
1. Estrés Oxidativo en la EA	13
1.1 Peroxidación lipídica	13
1.2 Ferroptosis	14
1.3 Oxidación de proteínas	14
1.4 Oxidación del ADN	14
1.5 Productos de glicación avanzada en la EA	15
1.6 Neurodegeneración en la EA.....	15
1.7.1 Apoptosis en la EA.....	16
1.7.2 Degeneración Sináptica en la EA.....	16
1.8 Neuroinflamación en la EA	16
1.8.1 Microglías	17
1.8.2 Astrocitos	18
1.9 Trastornos Neuropsiquiátricos asociados a la EA	18
1.9.1 Depresión	19
1.9.2 Ansiedad.....	19
2.0 Modelo de envejecimiento acelerado con D-galactosa.....	19
OBJETIVOS.....	22
1. Objetivo general:.....	22
2. Objetivos específicos:	22
3. Hipótesis	22
JUSTIFICACIÓN	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Animales.....	23
1.1 Cepas.....	23

1.2	Grupos de estudio	23
1.3	Manejo previo	23
1.4	Habitación	23
2.	Ensayos conductuales	24
2.1	Prueba de Campo Abierto	24
2.2	Prueba de Interacción Social	24
2.3	Prueba de Brazo elevado en cruz	24
2.4	Prueba de Caja luz oscuridad	24
2.5	Prueba de Nado Forzado	24
2.6	Prueba de la Preferencia por la Sacarosa	24
3.	Obtención y almacenamiento de tejido cerebral	25
3.2	Anestesia	25
3.3	Obtención de tejido cerebral	25
3.4	Disección y almacenamiento del cerebro (tejidos que serán sometidos al procedimiento de la tinción de Golgi)	25
3.5	Obtención y almacenamiento de secciones	25
4.	Ensayos exvivo	26
4.1	Detección de anticuerpos para la caracterización morfológica utilizando inmunohistoquímica por cromógeno	26
4.2	Anti-NeuN	26
4.3	Anti-IBA-1	27
4.4	Anti-GFAP	27
5.	Imagenología	28
5.1	Obtención de imágenes en el microscopio de campo claro	28
5.2	Conteo automático de las neuronas marcadas con NeuN	28
5.3	Grosor del hipocampo	33
5.4	Conteo de Glías	33
5.5	Colocalización sináptica de PSD95 y Sinapsina I	34
5.6	Adquisición de imágenes en el microscopio confocal	34
5.7	Cuantificación de los marcadores sinápticos y sus colocalizaciones utilizando el Software ImageJ	34
6.	Análisis estadístico	35
	RESULTADOS	36

1. Evaluación de Trastornos Neuropsiquiátricos	36
1.1. Campo Abierto.....	36
1.2 Interacción Social.....	37
1.3 Brazo Elevado en Cruz	38
1.4 Prueba de la caja luz/oscuridad.....	39
1.5 Nado forzado.....	40
1.6 Preferencia por la sacarosa.....	41
2. Caracterización Morfológica	42
2.1. NeuN	42
2.2 GFAP	43
2.2 IBA1.....	44
3. Caracterización sináptica	45
3.1. PSD95	45
3.2 Sinapsina I.....	46
3.3 Colocalización.....	47
DISCUSIÓN	49
1. Evaluación de trastornos neuropsiquiátricos.....	49
1.1 Prueba de campo abierto.....	49
1.2 Prueba de brazos elevados en cruz.....	50
1.3 Prueba de preferencia por la sacarosa	50
2. Caracterización Morfológica	51
2.1 NeuN.....	51
2.2 GFAP e IBA1.....	52
3. Caracterización sináptica.....	53
CONCLUSIONES.....	54
Evaluación de trastornos neuropsiquiátricos:	54
Caracterización Morfológica:	54
Caracterización Sináptica:	54
LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES	55
FUTUROS ESTUDIOS	56
Análisis de Sholl	56
Habénula.....	56

Amígdala.....	57
Fenotipo de las Microglías.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	69
1A. Neuronas teñidas con la tinción de Golgi.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. No. 1. Ensayos conductuales para la evaluación de trastornos neuropsiquiátricos	23
Fig. No. 2. Menú principal de ImageJ	29
Fig. No. 3. Imágenes sobrepuestas.....	30
Fig. No. 4. Extensión synapse counter.....	31
Fig. No. 5. Resultados del procesamiento de imágenes de la extensión synapse counter	32
Fig. No. 6. Número de Neuronas en el ROI analizado	33
Fig. No. 7. Configuraciones en la extensión synapse counter	35
Fig. No. 8. Prueba de Campo Abierto.....	36
Fig. No. 9. Prueba de Interacción Social	37
Fig. No. 10. Brazo Elevado en Cruz	38
Fig. No. 11. Prueba de la Caja Luz/Oscuridad	39
Fig. No. 12. Prueba de Nado Forzado.....	40
Fig. No. 13. Prueba de la Preferencia por la Sacarosa.....	41
Fig. No 14. Células neuronales en el CA1 del hipocampo	42
Fig. No 15. Densidad de Astrocitos en el hipocampo.....	43
Fig. No. 16. Densidad de microglías en el hipocampo	44
Fig. No. 17. Puncta de PSD95 en el hilus del hipocampo	45
Fig. No 18. Número de puncta en el hilus del hipocampo.....	46
Fig. No 19. Colocalización sináptica de PSD95 y Sinapsina I.	48
Fig. No. 20. Habénula teñida con NeuN y GFAP e IBA1	57
Fig. No. 21. Amígdalas teñidas con NeuN y GFAP	58
Fig. No 22. Resultados de los ensayos de Golgi.....	69

RESUMEN

Introducción: La Enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia que inhabilita la independencia en las actividades diarias del adulto mayor. Es una enfermedad neurodegenerativa que afecta mayormente a mujeres que a hombres. Presenta desórdenes en el comportamiento, como trastornos neuropsiquiátricos (ansiedad y depresión) en el 97% de los casos previos a la etapa de demencia y alteración de procesos moleculares como el estrés oxidativo en las células neuronales.

Objetivos: Analizar conductas neuropsiquiátricas en un modelo de envejecimiento acelerado en ratas hembra y evaluación de caracterizaciones morfológicas (neuronas, microglías y astrocitos) y sinápticas en el hipocampo.

Métodos: Evaluamos trastornos neuropsiquiátricos en ratas hembra *Sprague-Dawley* en un modelo de envejecimiento acelerado utilizando pruebas conductuales para ansiedad (campo abierto, brazo elevado en cruz, caja luz/oscuridad) y depresión (interacción social, nado forzado, preferencia por la sacarosa). Realizamos una caracterización morfológica de neuronas y glías (microglías y astrocitos) mediante inmunohistoquímica con cromógeno y evaluaciones sinápticas utilizando marcadores pre (Sinapsina I) y post (PSD95) sinápticos a través de inmunohistoquímica con fluorescencia.

Resultados: Encontramos resultados significativos para los trastornos de ansiedad en las pruebas de campo abierto y brazo elevado en cruz en el grupo tratado con D-Gal. También encontramos una disminución en la cantidad de neuronas presentes en el hipocampo en las ratas tratadas con D-gal y un aumento en el número de astrocitos.

Conclusiones: El modelo de envejecimiento acelerado con D-gal es un buen modelo para evaluar trastornos de ansiedad, procesos neurodegenerativos y neuroinflamatorios en las ratas hembra *Sprague-Dawley*.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, envejecimiento, D-galactosa, ansiedad, depresión, neurona, microglía, astrocito, sinapsis

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease is the leading cause of dementia that impairs independence in the daily activities of the elderly. It is a neurodegenerative disease that affects women more than men. It presents behavioral disorders, such as neuropsychiatric disorders (anxiety and depression) in 97% of cases prior to the dementia stage, and alteration of molecular processes such as oxidative stress in neuronal cells.

Objectives: To analyze neuropsychiatric behaviors in an accelerated aging model in female rats and to evaluate morphological (neurons, microglia, and astrocytes) and synaptic characterizations in the hippocampus.

Methods: We evaluated neuropsychiatric disorders in female Sprague-Dawley rats in an accelerated aging model using behavioral tests for anxiety (open field, elevated plus maze, light/dark box) and depression (social interaction, forced swim test, sucrose preference). We performed a morphological characterization of neurons and glial cells (microglia and astrocytes) using chromogen immunohistochemistry and synaptic evaluations using pre-synaptic (Synapsin I) and post-synaptic (PSD95) markers through fluorescence immunohistochemistry.

Results: We found significant results for anxiety disorders in the open field and elevated plus maze tests in the D-Gal-treated group. We also found a decrease in the number of neurons present in the hippocampus in the D-Gal-treated rats and an increase in the number of astrocytes.

Conclusions: The accelerated aging model with D-gal is a good model for evaluating anxiety disorders, neurodegenerative as well as neuroinflammatory processes in Sprague-Dawley female rats.

Key words: Alzheimer's disease, aging, D-galactose, anxiety, depression, neuron, microglia, astrocyte, synapse

ABREVIATURAS

1- α GFAP: Anticuerpo primario de la Proteína Ácida Fibrilar Glial

1- α IBA1: Anticuerpo primario de la molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1

1- α NeuN: Anticuerpo primario de la proteína de los núcleos neuronales

2 α -mouse-HRP: Anticuerpo secundario de ratón conjugado con la peroxidasa de rábano picante

2 α -rabbit-HRP: Anticuerpo secundario de conejo conjugado con la peroxidasa de rábano picante

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

AGE: Productos de glicación avanzada

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

APOE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora de amiloide beta

AR: Aldosa reductasa

ATP: Adenosín trifosfato

A β : Amiloide beta

BACE-1: beta-secretasa 1

BPSD: Síntomas conductuales y psicológicos de la demencia

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

C1q: Complemento componente 1q

C3: Complemento componente 3

CA1: *Cornus ammonis* 1

CD11b: Molécula de diferenciación 11b

CDK5: Quinasa dependiente de ciclina 5

COX-2: Ciclooxygenasa-2

CR3: Complemento receptor 3

DAB: 3, 3'-diaminobenzidine

D-gal: D-galactosa

EA: Enfermedad de Alzheimer

FYN: quinasa fyn

GABAr: Receptor del ácido gamma-aminobutírico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GHS: Glutación

GPX4: Glutación peroxidasa 4

GSK3 β : Glucógeno sintasa quinasa 3 beta

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IBA1: Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1

IL: Interleucina

INDICASAT: Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología

iNOS: Óxido nítrico sintasa

ITGAM: Integrina alfa M.

L-Gal: L-Galactosa

MDA: Malondialdehído

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NeuN: Núcleos neuronales

NF-kB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NFT: Ovillos neurofibrilares

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico

P16: Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina 16 (p16INK4a)

P21: Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina 1 (p21Cip1/Waf1)

P53: Proteína 53 (TP53, Tumor Protein 53)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PDS95: Proteína de densidad postsináptica 95

PFA: Paraformaldehído

RAGE: Receptor de AGE

ROI: Región de interés

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDH: Sorbitol deshidrogenasa

SLC7A11: Miembro 11 de la familia de transportadores de solutos 7

SNC: Sistema nervioso central

SO: Stratum oriens

SP: Stratum pyramidale

SYN-1: Sinapsina I

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

α M: Integrina subunidad alfa M.

β -secretasa: beta secretasa

γ -secretasa: gama secretasa

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa cuyas manifestaciones se observan en cambios en el comportamiento, pérdida de memoria y deterioro cognitivo. Presenta síntomas como la depresión, la ansiedad, comportamientos agresivos y alucinaciones. Es la principal causa de demencia y se calcula que más de 50 millones de personas a lo largo del mundo padecen demencia asociada este tipo de enfermedad neurodegenerativa (Herrmann & Lanctôt, 2007; Vaz & Silvestre, 2020).

Mas aún, un estudio clínico que se realizó a lo largo de dos décadas reveló que los hombres de 65 años presentan una vida útil restante del 6.3% y un 10.9% de probabilidades de desarrollar algún tipo de demencia; mientras que las mujeres con la misma edad presentan casi el doble de estas cifras (12 % y 19%) lo que demuestra la tendencia en relación con la edad y el sexo (Podcasy & Epperson, 2022). Se estima que para el 2050 seguirá habiendo mayores casos de mujeres con demencia que hombres (Nichols et al., 2022a).

97% de las personas con EA experimentarán al menos un síntoma neuropsiquiátrico o un síntoma psicológico conductual de la demencia (BPSD, por sus siglas en inglés, *Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia* o Síntomas Conductuales y Psicológicos de la demencia) (*Alzheimer's Statistics* | *Alzheimers.Net*, n.d.; García-Alberca et al., 2010) los cuales incluyen apatía, depresión y alteraciones en los ciclos de sueño, como sueño fragmentado, dificultades para entrar en un sueño profundo y una tendencia a despertarse muy temprano (Kitazawa et al., 2004).

Es importante comprender la contribución de los BPSD y su interacción con las patologías asociadas a la EA especialmente por el impacto que podría incidir dentro del contexto del diagnóstico clínico de la EA (Yang et al., 2018).

En roedores se ha evidenciado que las administraciones de D-galactosa (D-Gal) a largo plazo pueden aumentar las especies reactivas de oxígeno, ampliar niveles de marcadores que indiquen elevación de estrés oxidativo y otras afecciones que ocurren dentro de la fisiopatología de la EA lo que hace de éste un buen modelo de estudio para esta enfermedad (Shwe et al., 2018a). Investigaciones previas también han revelado la relación entre una administración crónica de D-Gal en roedores y el deterioro en el aprendizaje y la memoria.

D-Gal puede ser usado de manera satisfactoria si es administrada subcutáneamente o intraperitonealmente (Chogtu et al., 2018a). Se ha demostrado que la administración de D-Gal durante 6-10 semanas produce disfunción mitocondrial, daño en el hipocampo y pérdida de proteínas (Banji et al., 2014a). Un estudio realizado con ratas *Sprague-Dawley* hembras encontró que realizar una ovariectomía junto administraciones de D-Gal induce un mayor deterioro cognitivo que si solo se administra la sustancia (Faradila et al., 2022). Sin embargo, se desconoce si en este modelo alternativo de la EA se expresan BPSA.

Con este estudio buscamos validar el modelo de envejecimiento acelerado de Alzheimer utilizando dosis crónicas de D-Gal, describir los cambios fisiológicos generados a nivel celular y sináptico en el hipocampo, que es la principal estructura afectada en la EA, y evaluar trastornos neuropsiquiátricos mediante pruebas de ansiedad —campo abierto, brazo elevado en cruz y caja luz-oscuridad— y depresión —interacción social, nado forzado y la prueba de preferencia por la sacarosa — en ratas hembra de la colonia *Sprague-Dawley* del bioterio de INDICASAT AIP.

MARCO TEÓRICO

La demencia es un término general que se utiliza para describir un conjunto de síntomas. Entre estos se destacan las dificultades con la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades cognitivas que afectan la capacidad de una persona para realizar actividades cotidianas. (Alzheimer's Disease Facts and Figure, 2024)

La EA es el tipo más común de demencia. Se distingue principalmente por la acumulación extracelular de péptido de β -amiloide ($A\beta$) y la formación de ovillos neurofibrilares (NFT) dentro de las células ocasionando una pérdida significativa de las conexiones sinápticas, células neuronales y gliales. Desde que fue identificada la EA a principios del siglo XX, se ha convertido en un desafío importante para la salud ya que aún no existe cura (Zheng & Wang, 2024). Además, la EA se considera una enfermedad multifactorial debido a la implicación de otros procesos patológicos, tales como la desestabilización del citoesqueleto, desequilibrio de iones y neurotransmisores, acumulación de metales pesados, plegamiento incorrecto de proteínas, mutaciones genéticas y daño por estrés oxidativo (Carreiras et al., 2014).

1. Estrés Oxidativo en la EA

El estrés oxidativo se define como un aumento, ya sea temporal o prolongado, de los niveles constantes de especies reactivas de oxígeno (ROS). Altos niveles de ROS provocan modificaciones en las macromoléculas de la célula y podrían llevar a la muerte neuronal a través de procesos como la necrosis o la apoptosis. (Lushchak & Storey, 2021).

En el sistema nervioso central (SNC), las neuronas son particularmente sensibles al estrés oxidativo. Éste se intensifica en el cerebro a medida que envejecemos y es evidenciado por la presencia de marcadores de daño oxidativo, alteraciones en el metabolismo proteico, disfunción de las membranas celulares y lípidos comprometiendo la funcionalidad neuronal (Ionescu-Tucker & Cotman, 2021).

1.1 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es el proceso mediante el cual los lípidos son atacados por ROS con la energía suficiente para formar un radical orgánico que, al reaccionar con el oxígeno, genera un radical peroxilo. Este proceso puede provocar daños estructurales en las membranas celulares y generar productos oxidados, altamente reactivos y que modifican covalentemente macromoléculas, contribuyendo al daño tisular (Zana et al., 2007).

1.2 Ferroptosis

La ferroptosis es un tipo de muerte celular programada relacionada con el metabolismo del hierro, la peroxidación lipídica y el desequilibrio entre el daño oxidativo y la defensa antioxidante. Estos eventos ocurren en la EA y generan disfunción cognitiva (Feng et al., 2024).

El mecanismo de la ferroptosis inicia cuando la cistina (una forma de cisteína) ingresa a la célula a través del transportador miembro 11 de la familia de transportadores de solutos 7 (SLC7A11) en la membrana celular. La cistina se convierte en cisteína dentro de la célula y es utilizada para sintetizar glutatión (GHS), un antioxidante que es esencial para el funcionamiento de la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4). GPX4 es una enzima que reduce niveles de ROS lipídicos, protegiendo así a la célula del daño oxidativo. Cuando la actividad de GPX4 es inhibida, los lípidos peroxidados, generados debido al estrés oxidativo causado por la acumulación de hierro en las células a través de la reacción de Fenton, se acumulan en la membrana celular e inician la ferroptosis (Su et al., 2024).

1.3 Oxidación de proteínas

Las proteínas son el blanco de las reacciones de oxidación debido a su alta abundancia en células, tejidos extracelulares y fluidos corporales, además de su rápida reactividad con oxidantes. La descomposición que ocasiona el estrés oxidativo en los lípidos y carbohidratos genera intermediarios altamente reactivos que terminan atacando a las proteínas en diversos sitios funcionales. El daño oxidativo puede desencadenar modificaciones postraduccionales que alteran la composición, el plegamiento, la carga neta y la hidrofobicidad/hidrofilicidad de las proteínas, afectando su función como receptores, enzimas, transportadoras o proteínas estructurales (Kehm et al., 2021).

1.4 Oxidación del ADN

El daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) implica alteraciones fisicoquímicas en su estructura que son lo suficientemente significativas como para afectar la interpretación y transmisión de la información genética. Elevados niveles de ROS pueden incrementar el daño al ADN mitocondrial (ADNmt), que es altamente susceptible a estas sustancias (Andrés Juan et al., 2021).

En la EA, estos daños se acumulan predominantemente en las regiones promotoras involucradas en la plasticidad sináptica, el transporte vesicular y las funciones mitocondriales (Moreira et al., 2008).

1.5 Productos de glicación avanzada en la EA

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son un grupo heterogéneo de compuestos tóxicos sintetizados en el cuerpo a través de diferentes vías. Estas sustancias son capaces de modificar la estructura y función de las proteínas. La interacción de AGE junto su receptor (RAGE) genera ROS mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa. Esto, a su vez, activa el factor nuclear kappa B (NF- κ B), el cual promueve la expresión de varios genes de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), las interleucinas (IL)-1, IL-6 e IL-8 (ver Fig. 6). Estas citoquinas proinflamatorias estimulan aún más la actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, lo que incrementa la producción de ROS. Además, propician procesos neurodegenerativos, alteran la barrera hematoencefálica, activan procesos neuroinflamatorios, apoptosis y aumenta aún más el estrés oxidativo (Bhattacharya et al., 2023; Prasad, 2019).

1.6 Neurodegeneración en la EA

La neurodegeneración es una pérdida progresiva de neuronas que afecta la estructura y función cerebral y desregula los circuitos neuronales ya que no pueden renovarse de manera eficiente y afectan los procesos cognitivos (Wilson, David M. et al., 2023)

En la EA estos procesos comienzan con un daño sináptico acompañado de una pérdida de neuronas debido a múltiples factores, como la formación de estructuras similares a poros conformadas por oligómeros de péptidos de A β que alteran la integridad de las membranas neuronales (Rangubpit et al., 2024), alteraciones en los receptores de glutamato y excitotoxicidad ya que la activación excesiva de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) puede generar un aumento patológico de calcio y favorecer la muerte neuronal (Gautam et al., 2023), hiperexcitabilidad de los circuitos neuronales (Targa Dias Anastacio et al., 2022), disfunción lisosomal (Bailey et al., 2013) y mitocondrial (Song et al., 2021). También tienen lugar alteraciones en las vías de señalización que afectan la plasticidad sináptica, la muerte neuronal y la disminución de la neurogénesis adulta, que es la capacidad que tiene el hipocampo de generar nuevas neuronas luego haber llegado a la madurez (Salta et al., 2023)

Algunas proteínas de señalización favorecen la progresión de la EA como la quinasa fyn (FYN), que su activación excesiva puede provocar daño sináptico, la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β), que participa en la hiperfosforilación de la proteína tau, un proceso que lleva a la

formación de los ovillos neurofibrilares y la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) que al desregularse puede ocasionar daño sináptico e iniciar procesos apoptóticos (Crews et al., 2010).

1.7.1 Apoptosis en la EA

La apoptosis es una muerte celular programada que sigue una serie de eventos ordenados, donde las caspasas activadas descomponen proteínas y ADN de la célula, para su posterior eliminación (Behl, 2000). Las caspasas son una familia de enzimas que participan en la muerte neuronal provocada por los péptidos de A β . Estas enzimas también contribuyen a la escisión anormal de la proteína tau y su posterior formación en NFT. En la EA se observa una elevación transcripcional de diversas caspasas (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9) las cuales han mostrado desempeñar papeles importantes en la progresión de esta enfermedad (Dhage et al., 2023).

1.7.2 Degeneración Sináptica en la EA

Desde las primeras etapas de la EA, ocurre una pérdida de sinapsis, especialmente en el hipocampo y la corteza cerebral, progresando lentamente desde una fase de compensación funcional a una pérdida irreversible de sinapsis. La acumulación de oligómeros solubles de péptidos de A β y la disfunción de proteínas como la proteína precursora beta amiloide (APP) y tau contribuyen a la degeneración sináptica al interferir con la plasticidad y la transmisión sináptica (Arendt, 2009).

En la sinapsis normal, el procesamiento de la APP está equilibrado y no se producen proteínas insolubles. En la sinapsis disfuncional, hay una acumulación anormal de oligómeros de A β resultado del procesamiento alterado de la APP por la γ -secretasa y β -secretasa. La acumulación de A β induce toxicidad y disfunción sináptica. Por otra parte, la proteína tau hiperfosforilada contribuye aún más a la disfunción sináptica y desestabiliza la estructura neuronal desde el interior de la neurona. Los niveles aumentados de Ca²⁺ pueden desencadenar excitotoxicidad y provocar daño celular. Esta condición conduce a un desequilibrio en los niveles de neurotransmisores, junto con una alteración en el funcionamiento de los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABAR) y de glutamato, lo cual afecta la señalización sináptica y contribuye significativamente al deterioro cognitivo (Lin et al., 2022).

1.8 Neuroinflamación en la EA

La neuroinflamación es una respuesta inflamatoria específica del SNC dirigida principalmente por las células gliales (microglías y astrocitos) que liberan mediadores inflamatorios (citoquinas, quimiocinas) para defender a las neuronas y preservar su homeostasis (Piek & Tamussino, 2023).

Los procesos neurodegenerativos suelen estar acompañados de respuestas inflamatorias que desencadenan la activación de las células gliales (astrocitos y microglías) que se pueden evaluar utilizando marcadores inflamatorios (Guerreiro et al., 2020)

La molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (IBA1) es una proteína específica de microglías y macrófagos que se unen al calcio. Desempeña un papel importante en la organización del citoesqueleto de actina, lo que contribuye a funciones celulares como el repliegue de la membrana y la fagocitosis en la microglía activada. Esto significa que cuando la microglía se activa, IBA1 participa en la remodelación de la membrana celular y en la formación de estructuras que permiten a la célula moverse y fagocitar partículas (Ohsawa et al., 2004).

Desde su primera descripción en 1998, IBA1 se ha consolidado como el marcador más común para analizar a la microglía mediante técnicas de inmunohistoquímica. Aunque IBA1 se describe a menudo como un marcador de activación microglial, no permite diferenciar entre los distintos fenotipos funcionales de la microglía: reposo, activada, ameboide y distrófica (Lier et al., 2021).

1.8.1 Microglías

Las microglías son un tipo de células gliales residentes del SNC que tienen la capacidad de distribuirse a lo largo de la materia gris y blanca para defender al tejido neuronal ante una posible injuria. Las microglías ayudan a eliminar las placas de péptido de A β a través del proceso de fagocitosis, pero en procesos inflamatorios sostenidos y crónicos, liberan proteasas neurotóxicas y factores neuroinflamatorios (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α), radicales libres, proteínas del complemento y quimionas que pueden facilitar la acumulación de estas placas y contribuir aún más al desarrollo de la EA (Cai et al., 2014).

La poda sináptica es un proceso por el cual ciertas conexiones sinápticas son eliminadas para aumentar la eficiencia de la comunicación entre las neuronas (Santos, 2011). En la EA, la poda sináptica se encuentra desregulada debido a una hiperactivación de este proceso, que no solo elimina las sinapsis innecesarias, sino que también provoca una eliminación excesiva de conexiones sinápticas esenciales (Wen et al., 2024).

En esta poda intervienen proteínas del sistema de complemento, como C1q, C3 y CR3. Estas moléculas se unen a las sinapsis que deben ser eliminadas, facilitando que las microglías las identifiquen y las eliminen. La proteína ApoE3, una variante de la apolipoproteína E, también

participa en la regulación de este proceso, apoyando la homeostasis sináptica. En la EA, los niveles de las proteínas del complemento C1q, C3 y CR3 están alterados, lo que conduce a la marcación excesiva de sinapsis para su eliminación. Las microglías, en respuesta a estos cambios, eliminan sinapsis funcionales, lo que contribuye a la pérdida de conexiones neuronales esenciales para la función cognitiva. Además, la presencia de la variante ApoE4 (una isoforma de ApoE asociada a la EA) en lugar de ApoE3 agrava esta disfunción, ya que ApoE4 aumenta la susceptibilidad a la neurodegeneración y favorece la acumulación de desechos celulares (Lin et al., 2022).

1.8.2 Astrocitos

Los astrocitos se encargan de regular la dilatación de los vasos sanguíneos, suministran energía a las neuronas, mantienen el equilibrio iónico, regulan el volumen extracelular a través de las aquaporinas, controlan los niveles de glutamato y facilitan su reciclaje en el ciclo glutamato-glutamina. Los astrocitos también liberan gliotransmisores como glutamato, (adenosín trifosfato) ATP y D-serina que participan en la comunicación glial-neuronal y glial-glial; pueden modular la transmisión neuronal y afectar la plasticidad sináptica, lo que sugiere que son importantes en los procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje (Verkhratsky et al., 2010).

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína que se encuentra en las células astrocíticas del cerebro y es considerada un marcador de astrogliosis. (Matute-Blanch et al., 2017). La astrogliosis es la respuesta reactiva de los astrocitos en el SNC ante lesiones en el tejido neuronal (Franke & Illes, 2014). Este proceso abarca una amplia gama de cambios moleculares y funcionales que permiten la formación de una cicatriz glial como repuesta protectora. En condiciones normales, tienen una forma estrellada y expresan la proteína GFAP (Osborn et al., 2016).

1.9 Trastornos Neuropsiquiátricos asociados a la EA

Los trastornos neuropsiquiátricos se describen como condiciones que afectan tanto la función cerebral como el comportamiento y pueden manifestarse en diversas etapas de la vida. Estos trastornos a menudo presentan un curso variable, desde remitente hasta crónico o progresivo. Aunque algunos pueden no mostrar biomarcadores estructurales claros, la investigación actual está avanzando en la identificación de biomarcadores funcionales. El manejo de estos trastornos puede incluir tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, los cuales pueden aliviar los síntomas, aunque la reversión completa no siempre es posible (Baranova et al., 2024)

Los síntomas neuropsiquiátricos en la EA representan fenotipos conductuales complejos que afectan a la mayoría de los pacientes (entre el 80% y el 90%) en algún momento del curso de la enfermedad. Estos síntomas varían en severidad, desde manifestaciones leves como la depresión y la ansiedad, hasta otras más graves como la agitación y las alucinaciones. Se ha observado que los síntomas tienden a persistir o reaparecer con el tiempo, lo que contribuye al sufrimiento de los pacientes y sus cuidadores, y está asociado con un mayor riesgo de institucionalización y mortalidad (C. Lyketsos, O. López & Jones et al., 2002).

1.9.1 Depresión

Los estudios de revisión realizados por Sáiz-Vázquez et al. (2021) destacan la complejidad de la relación entre la depresión y la EA. Mientras que en algunos estudios se sugieren que la depresión podría ser un síntoma temprano o una respuesta a la neurodegeneración, otros indican que actúa como un factor de riesgo significativo para el deterioro cognitivo y el desarrollo de demencia. La evidencia es mixta en cuanto a si la depresión precede o sigue a la aparición de la EA. Sin embargo, se destaca que la depresión en la vejez duplica el riesgo de demencia y se asocia con un deterioro funcional y conductual más acelerado en pacientes con EA.

1.9.2 Ansiedad

La ansiedad es un estado caracterizado por preocupación excesiva, tensión, irritabilidad, pensamientos dispersos y disminución en el gusto por actividades que antes eran placenteras (Botto et al., 2022). En la EA, la prevalencia se encuentra alrededor del 40% en pacientes con deterioro cognitivo o demencia leve o en etapas tempranas de la enfermedad (Chen et al., 2018).

2.0 Modelo de envejecimiento acelerado con D-galactosa

La galactosa es un carbohidrato fundamental para la producción de energía y de otras funciones que contribuyen al metabolismo celular. Presenta dos enantiómeros: L-Galactosa (L-Gal) y D-Gal (Conte et al., 2021). Este último se utiliza especialmente para generar modelos de envejecimiento acelerado en roedores y realizar estudios con enfermedades asociadas a la vejez. (Long et al., 2007).

El envejecimiento es un proceso natural cuya manifestación más significativa es la neurodegeneración. Alteraciones en las funciones de los organelos pueden comprometer la integridad de las células neuronales. El desequilibrio de la mitocondria, por ejemplo, puede alterar

la homeostasis oxidativa y promover la formación de especies reactivas de oxígeno. (Banji et al., 2014b).

La concentración normal en sangre de D-Gal en ratas es menor a 1 mg/dL. En exceso puede inducir la producción de ROS y la posterior disfunción mitocondrial, generar AGEs, neuroinflamación, apoptosis neuronal (Gao et al., 2015; Hadzi-Petrushev et al., 2014; Jeong et al., 2021; Ma et al., 2018; Rehman et al., 2017; Shwe et al., 2018b; B. Zhang et al., 2021) y neurodegeneración (Firdaus et al., 2020; Ullah et al., 2015a). Se ha demostrado también que se da un incremento en la oxidación de lípidos y proteínas. (Aydın et al., 2018).

Se ha evidenciado que inyectar D-Gal a largo plazo puede aumentar los niveles de marcadores de AGE y RAGE, aldosa reductasa (AR), sorbitol deshidrogenasa (SDH), también genera acortamiento en la longitud de los telómeros, actividad de la telomerasa, β -secretasa 1 (BACE-1), y la proteína péptido de $A\beta$ (Shwe et al., 2018b).

Estudios previos han demostrado la relación entre una administración crónica de D-Gal en roedores y su capacidad de causar deterioro en el aprendizaje y la memoria. D-Gal puede ser usado de manera satisfactoria si es administrado subcutáneamente o intraperitonealmente. (Chogtu et al., 2018b). Se ha demostrado que la administración de D-Gal durante 6-10 semanas produce disfunción mitocondrial, daño en el hipocampo y pérdida de proteínas (Banji et al., 2014b).

En síntesis, la D-Gal provoca deterioro cognitivo, aumenta la producción de ROS, desequilibrando la homeostasis redox y causando peroxidación lipídica, lo que reduce la producción de ATP, provoca mutaciones en el ADNmt, afectando la función celular. Las alteraciones en la estructura mitocondrial y la reducción de enzimas de la cadena respiratoria provocadas por esta galactosa impactan la producción de energía celular. La formación AGE y la activación de RAGE contribuyen al envejecimiento celular y al acortamiento de telómeros, un indicador de envejecimiento acelerado. La D-gal incrementa los marcadores inflamatorios como la ciclooxygenasa-2 (COX-2), el óxido nítrico sintasa (iNOS), $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ y $NF-\kappa B$, y activa las microglías y astrocitos, fomentando la neuroinflamación. Además, se estimulan tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis, y se observa un aumento en la expresión de genes de senescencia como p16, p21 y p53. La peroxidación lipídica daña las membranas celulares y se forman productos de Amadori (productos intermedios en la glicación de proteínas), mientras que los compuestos de Schiff (productos iniciales de la reacción de glicación) provocan daño celular

por reacciones con aminas. Hay una disminución de enzimas antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa, y un aumento en los marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído (MDA) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El aumento de NADPH contribuye al estrés osmótico y se reduce la actividad de la acetilcolina junto con un incremento de los marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y al antígeno de diferenciación de células (CD11b), también conocido como integrina alfa M (αM) o ITGAM, que indican un estado de neuroinflamación (Huang et al., 2016).

El modelo de estrés oxidativo con D-Gal permite investigar los mecanismos del envejecimiento en roedores, ya que reproduce los efectos del envejecimiento natural en un período más corto al acelerar los procesos moleculares del envejecimiento convirtiéndose en un buen modelo para el estudio de enfermedades asociadas al envejecimiento como la EA (El-Far et al., 2022).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir cambios fisiológicos generados con administración crónica de D-Gal en ratas hembra *Sprague-Dawley* y trastornos neuropsiquiátricos asociados, como ansiedad y depresión.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la administración crónica de D-Gal en ratas *Sprague-Dawley* hembras utilizando pruebas conductuales para ansiedad y depresión.
2. Desarrollar una metodología para la evaluación sináptica (marcación presináptica y postsináptica) de neuronas hipocampales.
3. Caracterizar la morfología celular y sináptica postratamientos con D-Gal utilizando inmunohistoquímica y microscopía.

Hipótesis

H0: La administración crónica de D-Gal no produce efectos en la conducta, la morfología celular ni en las sinapsis de las neuronas del hipocampo.

H1: La administración crónica de D-Gal induce alteraciones en la conducta, la morfología celular y las sinapsis de las neuronas del hipocampo

JUSTIFICACIÓN

Se estima que más de 50 millones de personas a lo largo del mundo padecen de demencia tipo Enfermedad de Alzheimer. Se espera que esta cifra alcance los 150 millones para el año 2050. (Vaz & Silvestre, 2020b). Y se espera que para Panamá ésta llegue a alcanzar los 99 043 casos. (Nichols et al., 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

- 1.1 Cepas: ratas *Sprague-Dawley* hembra de 150-250g de peso bajo condiciones estándares de alimentación y agua *ad libitum* con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad siguiendo las normas establecidas por el bioterio de INDICASAT AIP.
- 1.2 Grupos de estudio: El estudio incluyó un total de 12 ratas divididas en dos grupos de 6 animales cada uno: un grupo control (sin tratamiento) y un grupo experimental tratado con D-Gal, administrado intraperitonealmente a una dosis de 120 mg/kg durante 6 semanas.
- 1.3 Manejo previo: antes de iniciar las administraciones, los animales pasaron por un proceso de manejo para familiarizarse con el investigador, asegurando una respuesta receptiva y cooperativa durante los ensayos conductuales.
- 1.4 Habitación: previo a cada prueba, los animales permanecieron en el cuarto destinado para la conducta durante 30 minutos. Todas las pruebas se realizaron a la misma hora (08:00-10:00 am) y se registraron utilizando el programa *Anymaze*

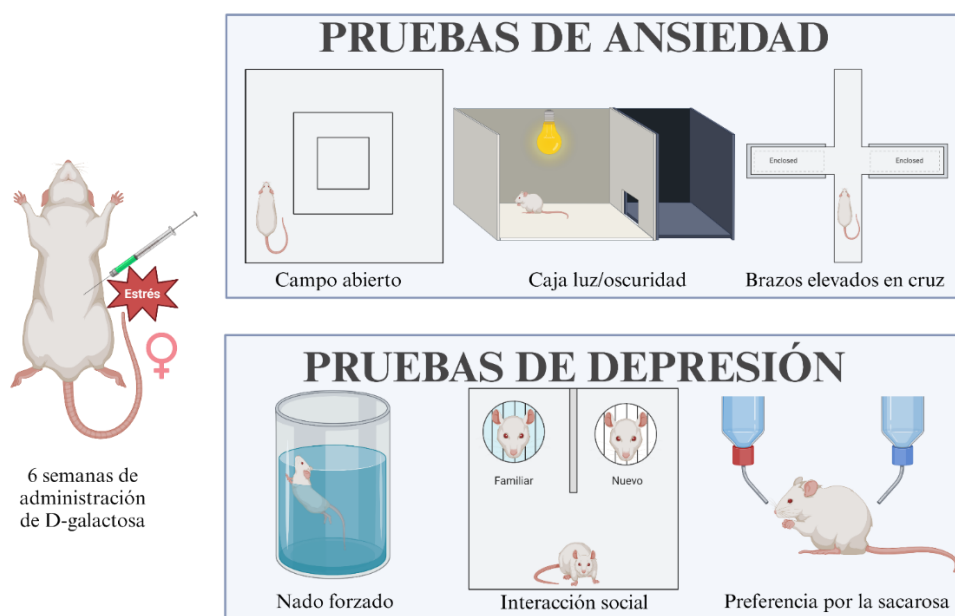


Fig. No. 1. **Ensayos conductuales para la evaluación de trastornos neuropsiquiátricos.** Se muestran las diferentes pruebas a las que fueron sometidas las ratas para la evaluación de trastornos neuropsiquiátricos luego de una administración crónica de seis semanas con D-Gal. Imagen creada en *biorender.com*

2. Ensayos conductuales

2.1 Prueba de Campo Abierto

Los animales se colocaron en un campo abierto e iluminado por 5 minutos. Se evaluó el tiempo que los animales pasaron en las tres zonas del campo abierto (Campo, centro y centro absoluto) ver (Fig. No. 1) (Denenberg, 1969).

2.2 Prueba de Interacción Social

Esta prueba se dividió en dos días. El primer día de la prueba hubo dos jaulas, una con una rata no experimental (desconocida) y la otra jaula permaneció vacía. Se colocó al animal experimental en el campo de manera libre y se analizaron las interacciones con el animal en la jaula durante 10 minutos. En el segundo día, el animal del día anterior pasó a la jaula que estaba vacía y el animal nuevo ocupó la otra jaula. Durante 10 minutos se evaluaron las interacciones entre el animal experimental y los animales no experimentales (animal nuevo y animal familiar) (Amada et al., 2022a).

2.3 Prueba de Brazo elevado en cruz

Los animales se colocaron en el centro de un laberinto constituido por cuatro brazos (dos abiertos y dos cerrados) que tienen una elevación de 50 cm desde el suelo y que en su conjunto se acomodan en una forma de cruz. Se midió durante 5 minutos el tiempo que pasaron en el centro, en los brazos abiertos y cerrados (R.G., 1987).

2.4 Prueba de Caja luz oscuridad

Se colocaron a los animales en un dispositivo conformado por dos cámaras conectadas entre sí (una completamente iluminada y la otra completamente oscura). Durante 5 minutos se registró el tiempo que pasaron los animales en las dos zonas (Britton & Bethancourt, 2009).

2.5 Prueba de Nado Forzado

En el primer día los animales se habituaron al laberinto colocándolos en un cilindro abierto con agua a $\sim 21^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Pasadas las 24 horas se colocaron en el mismo cilindro y se registró el tiempo de movilidad e inmovilidad durante 5 minutos (Sara et al., 2022).

2.6 Prueba de la Preferencia por la Sacarosa

Los animales atravesaron esta prueba durante 9 días. Los seis primeros días fueron de habituación (3 días con agua y 3 días con sacarosa al 1%). En los últimos 3 días se realizaron las evaluaciones experimentales (a partir de aquí tienen una botella con agua y otra con

sacarosa al 1%). Se registró el consumo diario de agua y sacarosa y se calculó la preferencia por la sacarosa (%) (Büki et al., 2022)

$$\% = \left(\frac{\text{Volumen consumido de solución de sacarosa}}{\text{Volumen consumido de solución de sacarosa} + \text{volumen consumido de agua}} \right) \times 100$$

3. Obtención y almacenamiento de tejido cerebral

3.1 Anestesia

Culminado el último día de conducta, los animales fueron anestesiados utilizando ketamina (concentración: 100 mg/mL; dosis: 100 mg/kg) y xilacina (concentración: 20 mg/mL; dosis: 10 mg/kg) empleando las dosis recomendadas por el bioterio de INDICASAT-AIP para la obtención del tejido.

3.2 Obtención de tejido cerebral

Una vez el animal se encontró en el plano anestésico se procedió a exponer el corazón haciendo cortes en las paredes torácicas y removiendo el diafragma. Se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo y se perfundió con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un volumen de 250 mL para eliminar todo el excedente de sangre y se fijó utilizando paraformaldehído (PFA) al 4% con un volumen de 250 mL.

Luego de la decapitación se procedió a extraer el cerebro sujetando los huesos del cráneo con pinzas y aplicando presión hacia los laterales (teniendo cuidado de no generar mucha presión sobre el cerebro y dañar sus estructuras). Se colocó en formalina durante 24 horas y se pasó a una solución de sacarosa al 30% para evitar la formación de cristales al momento de cortarlos en frío.

3.3 Disección y almacenamiento del cerebro (tejidos que serán sometidos al procedimiento de la tinción de Golgi)

Los animales fueron anestesiados en una cámara con isoflurano hasta alcanzar el plano anestésico. Fueron colocados en una guillotina para posteriormente realizar la disección. Los cerebros fueron colocados en solución de Golgi durante 24 horas y luego en solución fresca de Golgi. Pasados 21, días los cerebros se colocaron en una solución de glucosa al 30% y a las 24 horas se colocaron en solución fresca de glucosa.

3.4 Obtención y almacenamiento de secciones

Las secciones se obtuvieron congelando el cerebro con dióxido de carbono sólido (CO_{2(s)}) y realizando cortes de 50 µm utilizando un micrótopo (Leica SM2000R, China). Luego se

pasaron a un plato con PBS y azida de sodio al 1% para preservarlas y evitar el crecimiento de microorganismos.

4. Ensayos ex vivo

Los ensayos ex vivo permiten estudiar directamente tejidos aislados de los organismos experimentales, preservando la estructura y características celulares in situ, pero fuera de su entorno natural. Este enfoque es especialmente útil para caracterizar procesos biológicos específicos, como la morfología celular y la expresión de proteínas, mediante técnicas como la inmunohistoquímica. En este estudio, se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica por cromógeno para detectar marcadores como núcleos neuronales (NeuN) utilizado para identificar y cuantificar neuronas maduras, la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (IBA1) para evaluar la expresión de las microglías y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para detectar la expresión de astrocitos. Estos marcadores fueron elegidos con el fin de evaluar la morfología y distribución de estas células en el hipocampo de las ratas.

El 3,3'-diaminobenzidina (DAB) es un cromógeno ampliamente utilizado en inmunohistoquímica debido a su capacidad para producir una señal visual permanente y fácilmente identificable. Cuando el DAB entra en contacto con la peroxidasa de rábano (HRP) en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se oxida, generando un producto insoluble de color marrón oscuro. Este precipitado se deposita en el sitio donde el anticuerpo está presente, permitiendo la localización precisa de la proteína objetivo.

4.1 Detección de anticuerpos para la caracterización morfológica utilizando inmunohistoquímica por cromógeno

Todos los lavados se realizaron utilizando PBS y con una duración de 5 minutos por lavado. Los procedimientos de inmunohistoquímica con cromógeno incluyeron el bloqueo con peroxidasa que es crucial para bloquear las peroxidases endógenas del propio tejido y evitar falsos positivos. A las secciones se les hizo pasar por una solución de bloqueo, crucial para mejorar la relación señal/ruido reduciendo la interferencia de fondo. Al bloquear los sitios no específicos en la membrana, se evita que los anticuerpos se unan en regiones no deseadas, permitiendo una señal más clara y eficaz.

4.2 Anti-NeuN

Las secciones se incubaron en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante una hora. Luego se incubaron en α -NeuN (1:300) a temperatura ambiente durante toda la noche. Al

siguiente día se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron las secciones en el anticuerpo secundario α -rabbit-HRP (1:2000). Se realizaron 3 lavados con PBS y las secciones se visualizaron utilizando el método de tinción con 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Se sumergieron en 300 μ L de solución de trabajo de DAB (1 gota o 30 μ L de DAB concentrado + 1000 μ L DAB diluyente) durante 10 minutos y se cubrieron con papel aluminio para evitar que reaccionara con la luz. DAB se usa como sustrato cromogénico para la peroxidasa de rábano (HRP), permitiendo la detección y visualización de antígenos en cortes de tejido. Al oxidarse en presencia de HRP y peróxido de hidrógeno, el DAB genera un precipitado marrón insoluble en agua, lo que facilita la localización del antígeno bajo microscopía óptica.

Las secciones atravesaron un último lavado con PBS y se montaron en el portaobjetos ordenando los cortes de hipocampos en orden anatómico (siguiendo el orden del atlas de Paxinos & Watson, pp. (1998, pp. 423–429). Finalmente, se les colocó medio de montaje y el cubreobjetos.

4.3 Anti-IBA-1

Las secciones se bloquearon utilizando una solución de bloqueo de peróxido de hidrógeno para eliminar las peroxidases endógenas y evitar falsos positivos durante 10 minutos. Luego de 2 lavados, se bloquearon utilizando una solución de bloqueo durante 10 minutos. Se realizaron 4 lavados y se colocaron en 1- α IBA1 (1:2000) durante toda la noche. Al siguiente día, se realizaron 4 lavados y las secciones se colocaron en Antipolivalente de cabra biotinilado durante 10 minutos. Se realizaron 4 lavados y luego se sumergieron en una solución de estreptavidina peroxidasa (*ver kit ab64261*) durante 10 minutos. Se realizaron 4 lavados y se revelaron utilizando el método de tinción de DAB (1 gota de DAB concentrado + 50 gotas de DAB diluyente) durante 10 minutos. Se lavaron 4 veces y se montaron en el portaobjetos ordenándolos en orden anatómico ascendente de los cortes hipocampo. Se les colocó medio de montaje y un cubreobjetos.

4.4 Anti-GFAP

Las secciones se incubaron en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante una hora. Luego se incubaron en α -GFAP (1:400) a temperatura ambiente durante toda la noche. Al siguiente día se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno y se incubaron las secciones en el anticuerpo secundario α -mouse-HRP (1:2000). Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y las secciones se visualizaron utilizando el método de tinción con

DAB. Se sumergieron en 300 μ L de solución de trabajo de DAB (1 gota o 30 μ L de DAB concentrado + 1000 μ L DAB diluyente) durante 10 minutos y se cubrieron con papel aluminio para evitar que reaccionara con la luz. Las secciones atravesaron un último lavado con PBS de 5 minutos y se montaron en el portaobjetos ordenando los cortes de hipocampos en orden anatómico (siguiendo el orden del atlas de Paxinos y Watson). Finalmente, se les colocó medio de montaje y el cubreobjetos.

5. Imagenología

5.1 Obtención de imágenes en el microscopio de campo claro

Las muestras se observaron bajo un microscopio de campo claro (Microscopio vertical digital Olympus BX53, Tokio, Japón) configurado con una fuente de luz ajustable utilizando el objetivo de 10x maximizando la resolución y el contraste de las imágenes. Se utilizó el software de captura de imágenes *cellSens Dimension* (versión 1.17; con cámara DP73, 17.3 megapíxeles de resolución, Olympus). El enfoque fue configurado mediante la calibración de balance de blancos y las imágenes fueron capturadas con una alta resolución.

5.2 Conteo automático de las neuronas marcadas con NeuN

1. Abrir ImageJ. Ir a *Image, color, Merge Channels*
2. Colocar dos imágenes que se quieran analizar en los canales rojo y verde (recordar las imágenes colocadas en los diferentes canales)
3. Las imágenes quedan sobrepuestas una encima de la otra
4. Ir a *Plugins* y abrir la extensión *synapsecounter*
5. Colocar los datos como se muestra en la imagen
6. Los resultados mostrarán varias imágenes. Elegir la teñida de negro con fondo blanco
7. Elegir los ROIs que se quieran analizar
8. Ir a *Analyze, Analyze particles* y colocar los datos que se muestran en la imagen
9. La cantidad de neuronas analizadas se muestran en el apartado de “*count*”

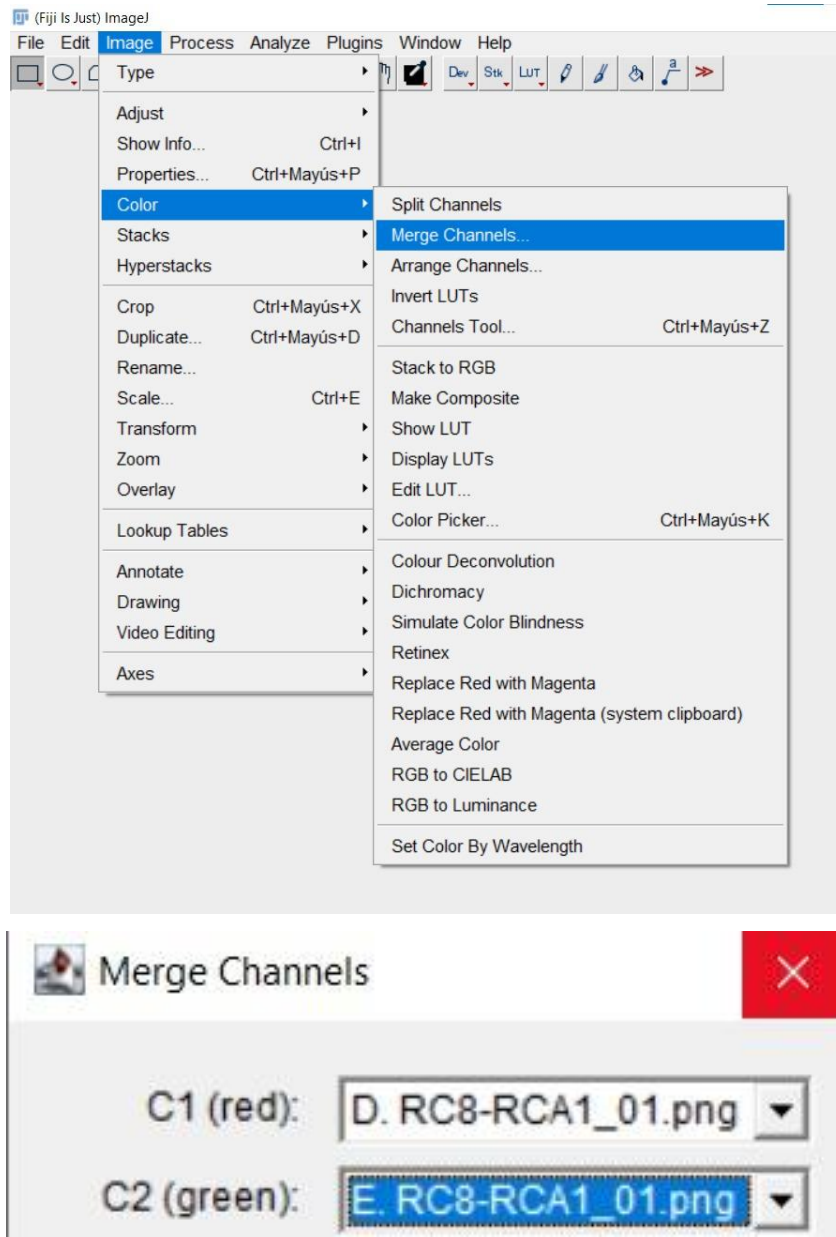


Fig. No. 2. **Menú principal de ImageJ.** Configurar las dos imágenes de NeuN en los canales rojo y verde que se quieran analizar y mezclarlas utilizando la opción “Merge Channels”.

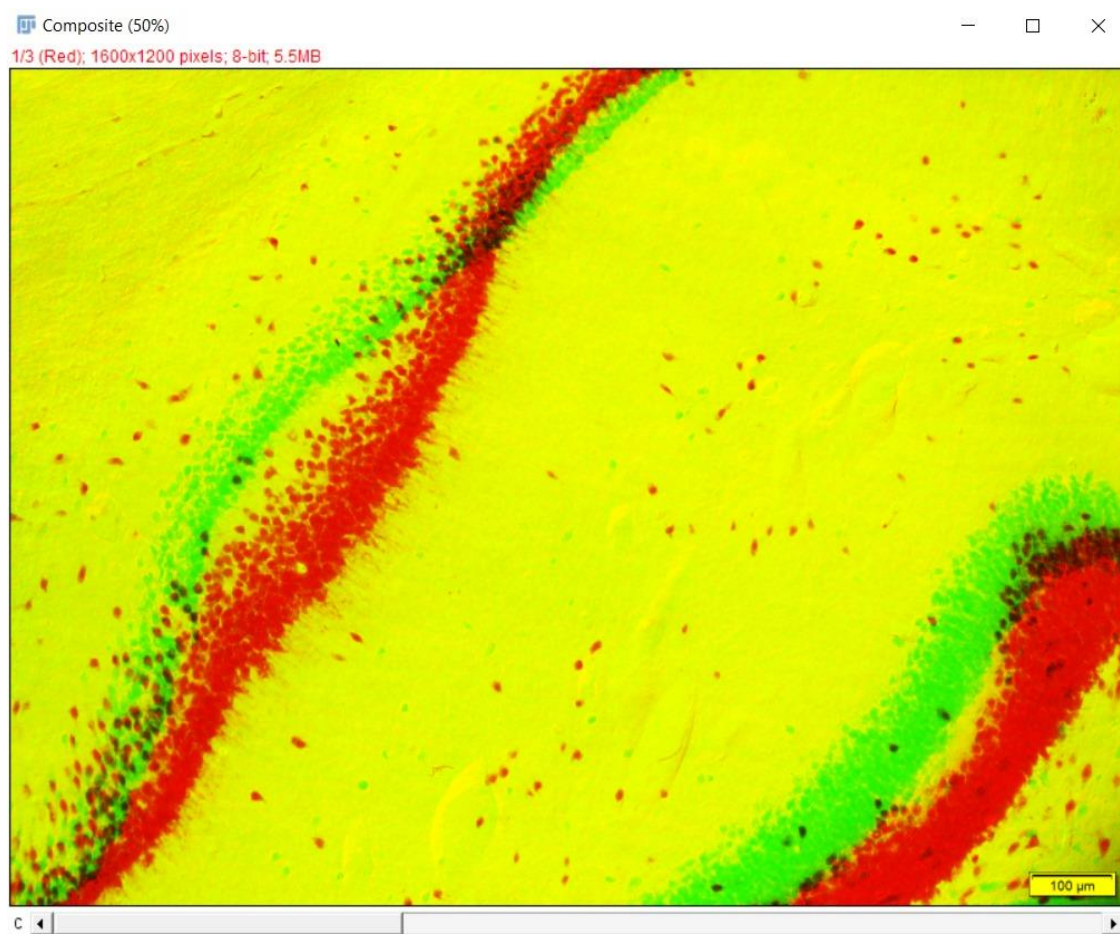


Fig. No. 3. **Imágenes sobrepuestas.** Esta imagen mezclada será útil a la hora de introducirla en la extensión *synapse counter* que luego las separará en formatos que permiten el conteo automático.


Analyze synapses
✕

Choose input source:
☒ current image
☐ batch mode:

Input dimensionality:
☐ 2D
☒ 3D

☐ search in subfolders

☐ Save intermediate files:

Analysis settings:

Image type:
Multi-channel ▼

Presynaptic protein channel:
C1 ▼

Postsynaptic protein channel:
C2 ▼

Resize image width:
0 px

Rolling ball radius:
10.0

Maximum filter radius:
2.0

Method for threshold adjustment:
Otsu ▼

Presynaptic particle size:
10 px² or voxels

Max. presynaptic particle size:
400 px² or voxels

Min. postsynaptic particle size:
10 px² or voxels

Max. postsynaptic particle size:
400 px² or voxels

Fig. No. 4. **Extensión synapse counter**. Colocar los datos que aparecen en la imagen y presionar “ok” para procesar las imágenes.

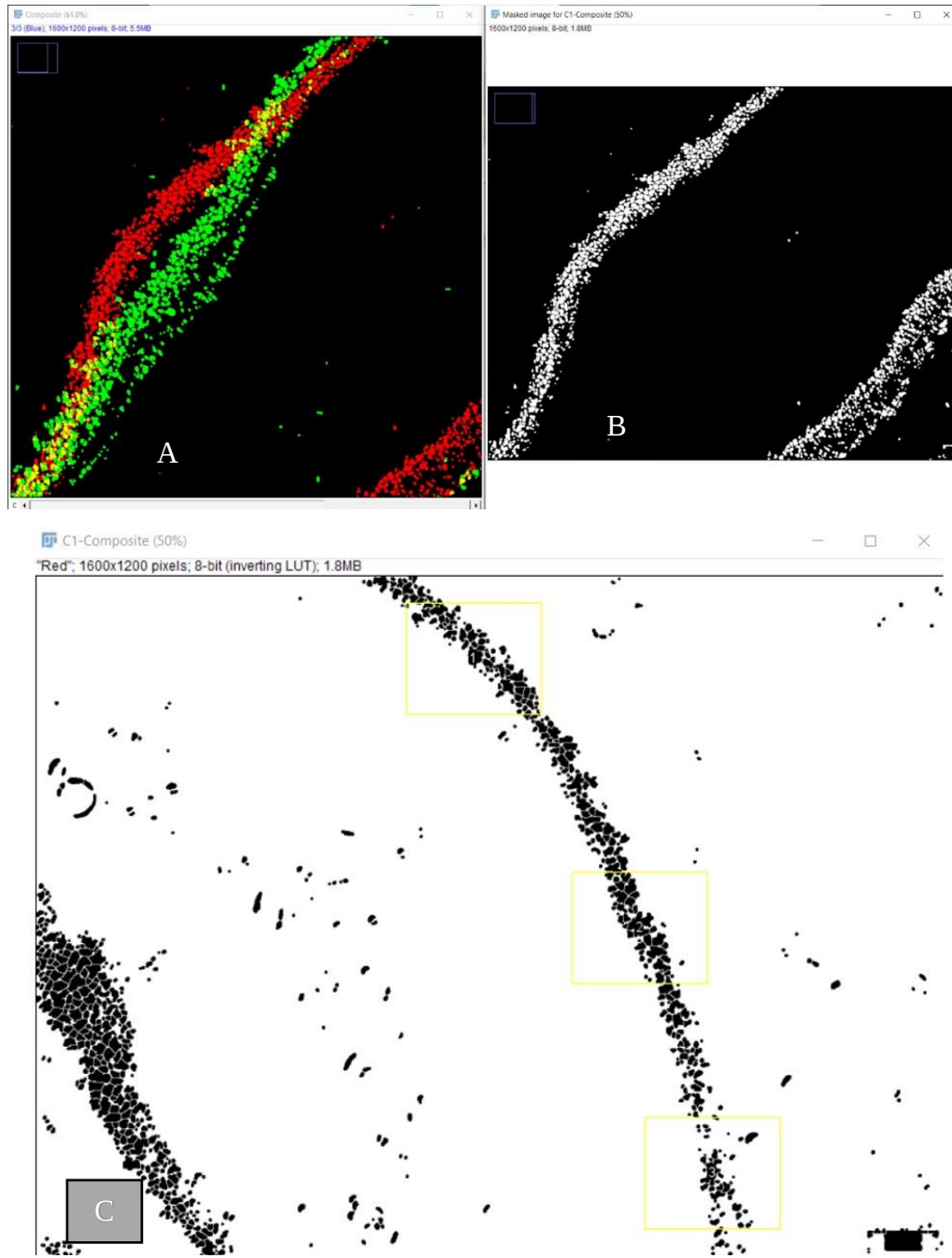


Fig. No. 5. **Resultados del procesamiento de imágenes de la extensión synapse counter.** La extensión arrojará varios formatos. Utilizar el de fondo blanco, colocar los ROIs para medir la cantidad de partículas presentes. A: imágenes sobrepuestas en canales rojos y verdes. B: imagen convertida en escala de grises. C: conteo automático utilizando 3 ROIs

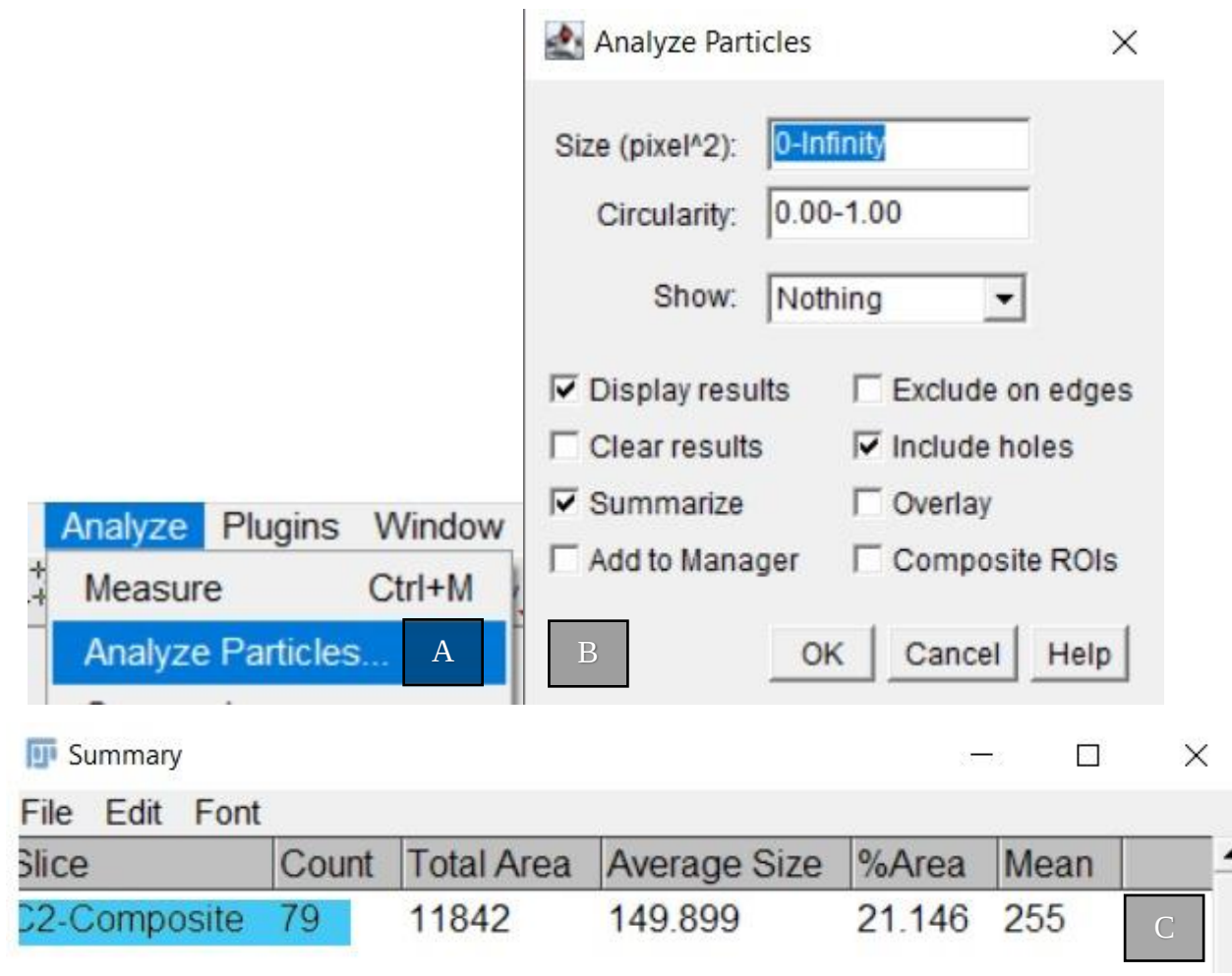


Fig. No. 6. **Número de Neuronas en el ROI analizado.** Luego de seleccionar el ROI, colocar *analyze* y luego *analyze particles* (A) y colocar la información correspondiente a la imagen (B). Se muestran los resultados del análisis (C).

5.3 Grosor del hipocampo

Para estimar el grosor del hipocampo, medimos tres líneas rectas (ROIs) a lo largo del hipocampo. El grosor estimado se mostró como $\frac{\text{cantidad de células en la línea recta}}{\text{longitud de la línea recta}}$

5.4 Conteo de Glías

El conteo de las glías se realizó manualmente utilizando **tres ROIs** distribuidas de manera uniforme a lo largo del **CA1 del hipocampo**. Para cada ROI, se empleó la herramienta "point tool" de ImageJ. Los datos obtenidos en cada ROI fueron promediados para generar un valor representativo del área estudiada.

5.5 Colocalización sináptica de PSD95 y Sinapsina I

Las muestras se calentaron en un baño maría a 100°C con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y un amortiguador de citrato (10 mM de ácido cítrico monohidratado $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, peso molecular: 210.14 g/mol, grado reactivo analítico distribuido por AppliChem, Alemania) durante 40 minutos para aumentar la porosidad de la membrana celular y garantizar una mayor penetración de los anticuerpos.

Se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 25 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS. Luego se colocaron en los anticuerpos primarios (1:500 Sinapsina I y 1:250 PSD95) hasta el día siguiente con un volumen final de 250 μ L por pocillo.

Se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el exceso de los anticuerpos primarios. Luego se incubaron en los anticuerpos secundarios (CF 633, 1:100; AF488, 1:1000) durante una hora. Se realizaron 3 lavados para eliminar el exceso de los anticuerpos secundarios, se montaron en la placa hasta secarse y se les colocó medio de montaje (*fluoroshield* de Abcam con DAPI) y un cubreobjetos. Las imágenes se procesaron utilizando un microscopio confocal (Olympus, FV-3000, microscopio confocal invertido 1X83, Japón).

5.6 Adquisición de imágenes en el microscopio confocal

Se utilizó un microscopio confocal Olympus de escaneo láser Zeiss FLV 3000 (microscopio confocal invertido 1X83, Japón) y el software FV31-ASW. Se escanearon una serie de imágenes a diferentes distancias focales en apilado z (“z-stacks”) utilizando el objetivo de 40x. Las imágenes tuvieron una resolución de 1024 x 1024 píxeles y en formato .oib y .tiff.

5.7 Cuantificación de los marcadores sinápticos y sus colocalizaciones utilizando el Software ImageJ

Para el conteo automático de las *puncta* de los marcadores sinápticos utilizamos la extensión de ImageJ “*synapse counter*”. Analizamos la *puncta* de PSD95, Sinapsina I y las colocalizaciones específicamente en el hilio (*hilus*) del giro dentado del hipocampo. Indicamos la escala (dato que se proporciona en el equipo confocal) y colocamos los datos solicitados en la extensión (ver Fig. 7. B) y procedimos a realizar una prueba *t-student* para los análisis estadísticos.

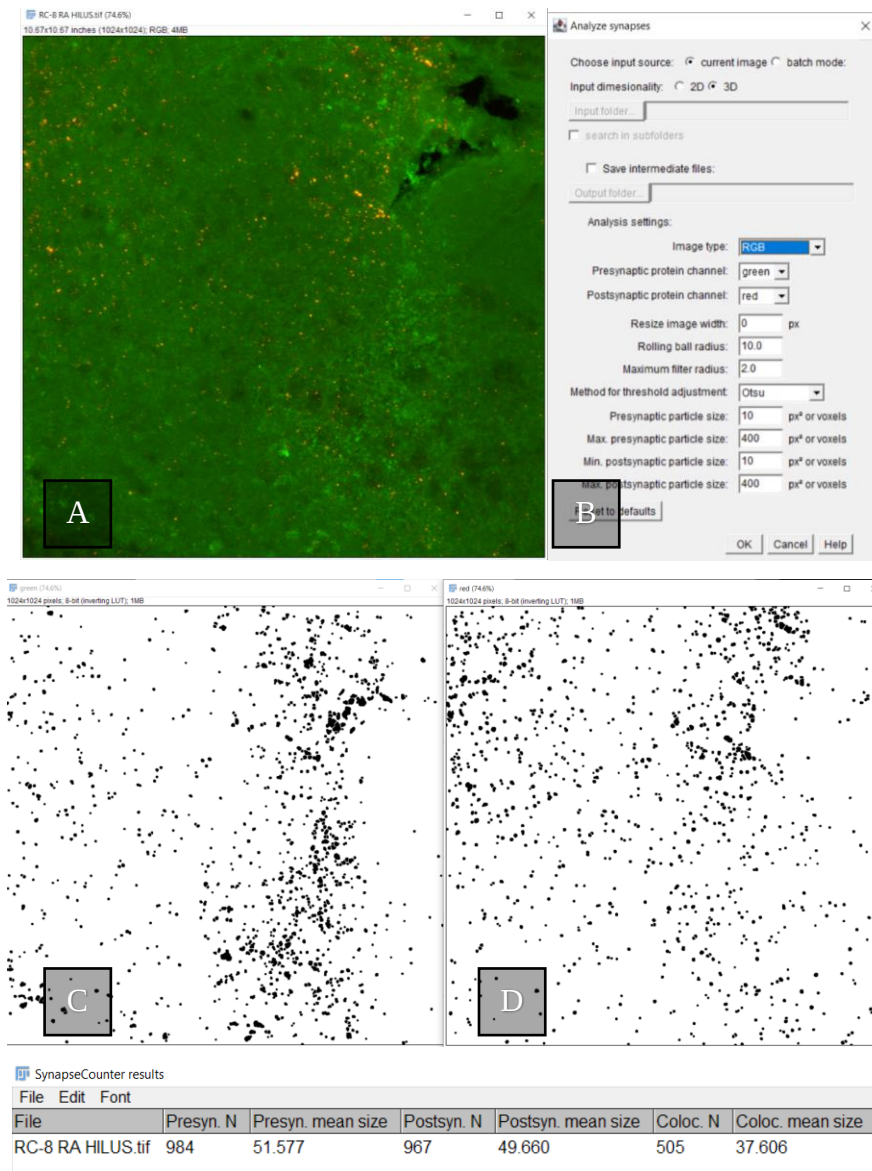


Fig. No. 7. **Configuraciones en la extensión synapse counter.** Configuraciones para obtener los datos de los marcadores sinápticos y las colocalizaciones en las *puncta*. En (A) se muestran las imágenes sobrepuestas pre y postsináptica. En (B) se muestran los datos para conseguir las *punctas* de ambos marcadores (C-D)

6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos, se empleó la prueba *t de Student* con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ error estándar de la media.

RESULTADOS

1. Evaluación de Trastornos Neuropsiquiátricos

1.1. Campo Abierto

La prueba de Campo Abierto se utilizó para evaluar la actividad exploratoria y los niveles de ansiedad en los animales. En la figura No. 8 se muestran las diferencias entre el grupo control y el grupo experimental en cuanto al tiempo que pasaron en el campo y en el centro absoluto del campo abierto.

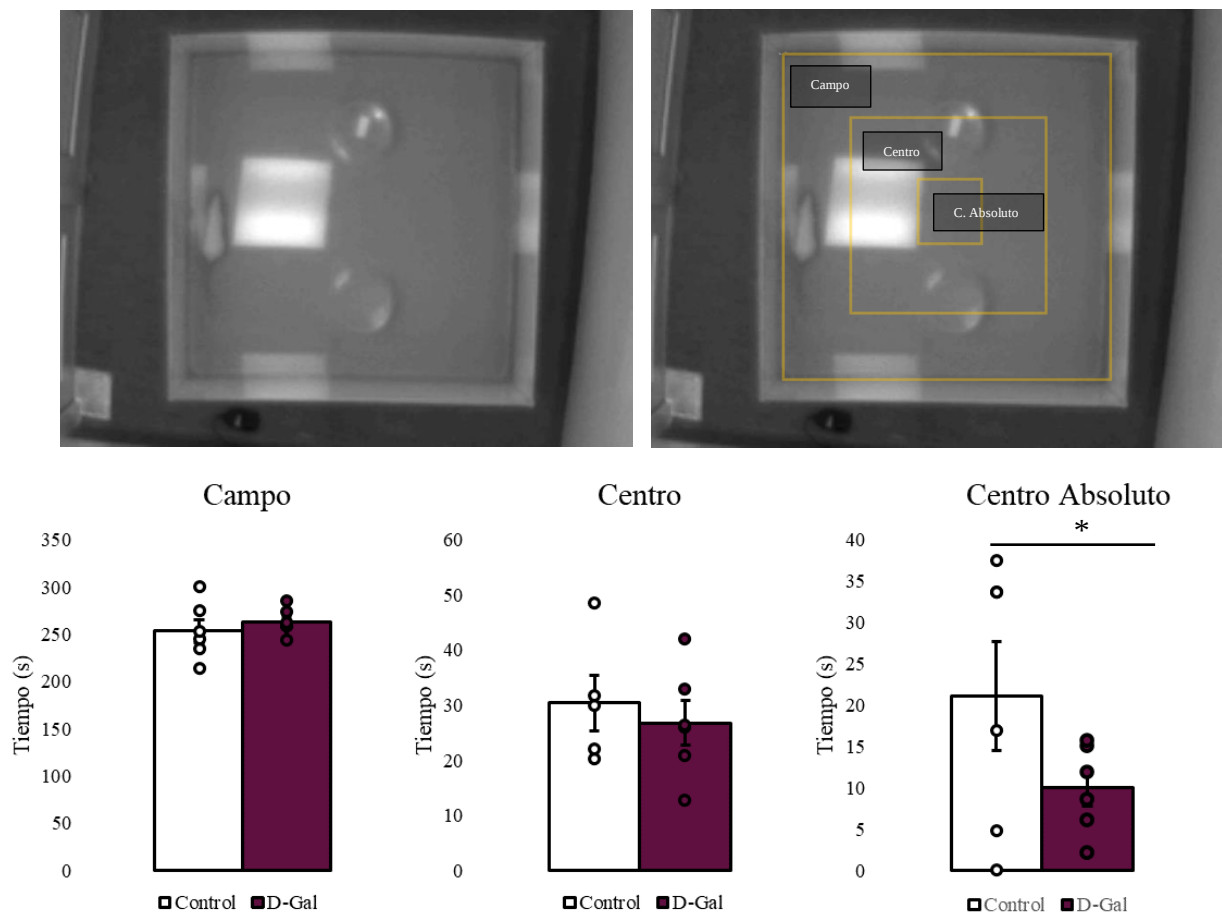


Fig. No. 8. **Prueba de Campo Abierto.** Se muestran las diferencias entre el grupo control y el grupo experimental para el tiempo que pasaron en el campo, centro y centro absoluto. Se encontraron diferencias significativas ($p=0.03$) en el tiempo que pasaron en el centro absoluto entre el grupo control y el grupo experimental. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=6, grupo experimental n=6.

1.2 Interacción Social

La prueba de Interacción Social mide la preferencia de los animales por interacciones sociales con individuos novedosos frente a conocidos. En la figura No. 9 se observa que el grupo tratado con D-gal muestra una preferencia mayor por el grupo novedoso en comparación con el grupo control, lo que sugiere alteraciones en el comportamiento social del grupo experimental.

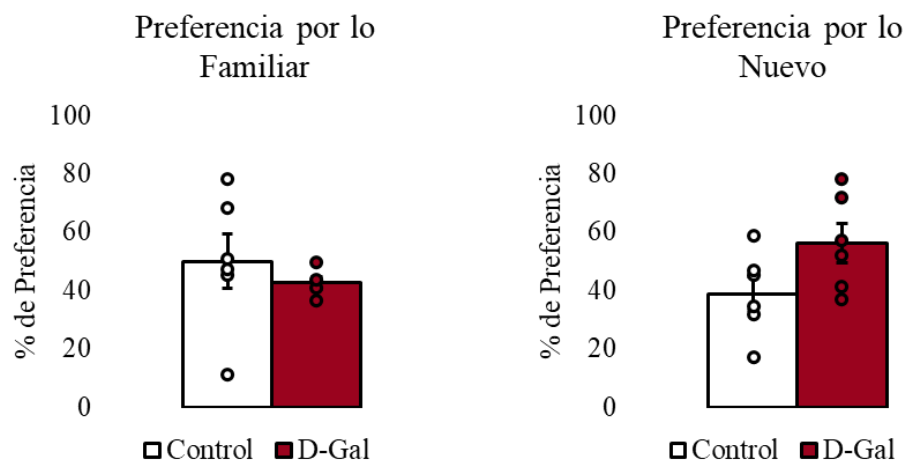
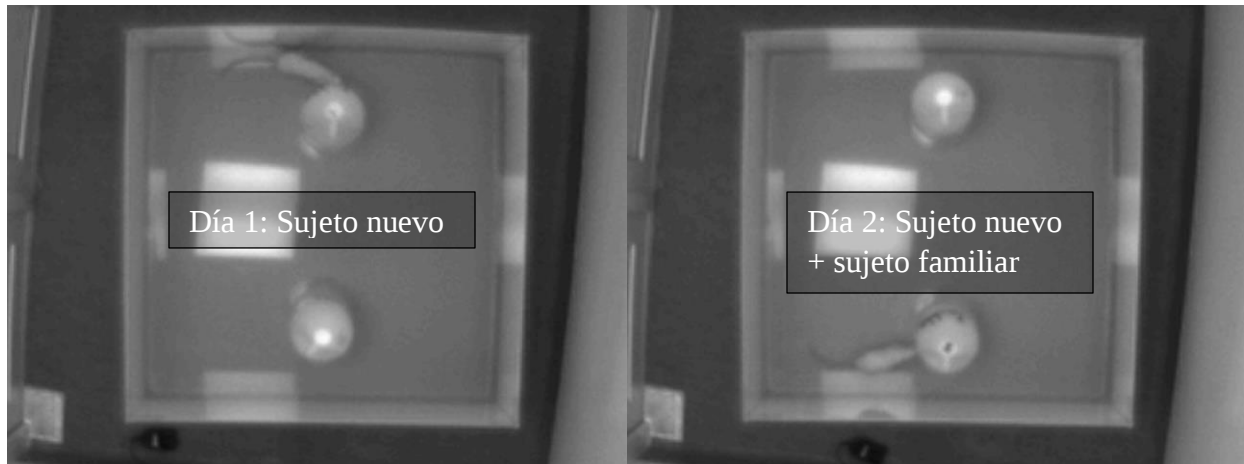


Fig. No. 9. **Prueba de Interacción Social.** Se observa una tendencia del grupo tratado con D-Gal al preferir el grupo novedoso, que el grupo control ($p>0.05$). Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=6, grupo experimental n=6.

1.3 Brazo Elevado en Cruz

La Prueba del Brazo Elevado en Cruz es una herramienta útil para medir niveles de ansiedad. En la figura No. 10 se aprecian diferencias significativas en el tiempo que las ratas tratadas pasaron en el centro del laberinto, comparado con el grupo control. Estas diferencias reflejan posibles cambios en el comportamiento ansioso inducido por el tratamiento.

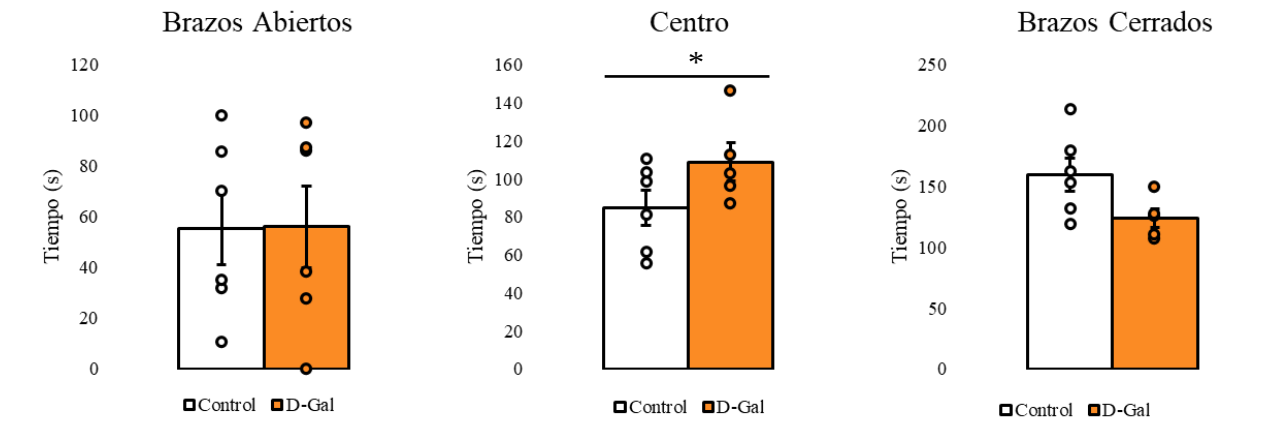


Fig. No. 10. **Brazo Elevado en Cruz.** Se muestran los resultados del tiempo que pasaron en brazos abiertos, brazos cerrados y el centro. Las ratas tratadas con D-Gal pasaron más tiempo en el centro ($p < 0.02$) con respecto al control. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=6, grupo experimental n=5.

1.4 Prueba de la caja luz/oscuridad

La prueba de Caja Luz/Oscuridad es una medida de la aversión innata a la luz, utilizada para evaluar los niveles de ansiedad. En la figura No 11 no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p>0.05$), lo que indica que el tratamiento no afectó el comportamiento de los animales en esta prueba.

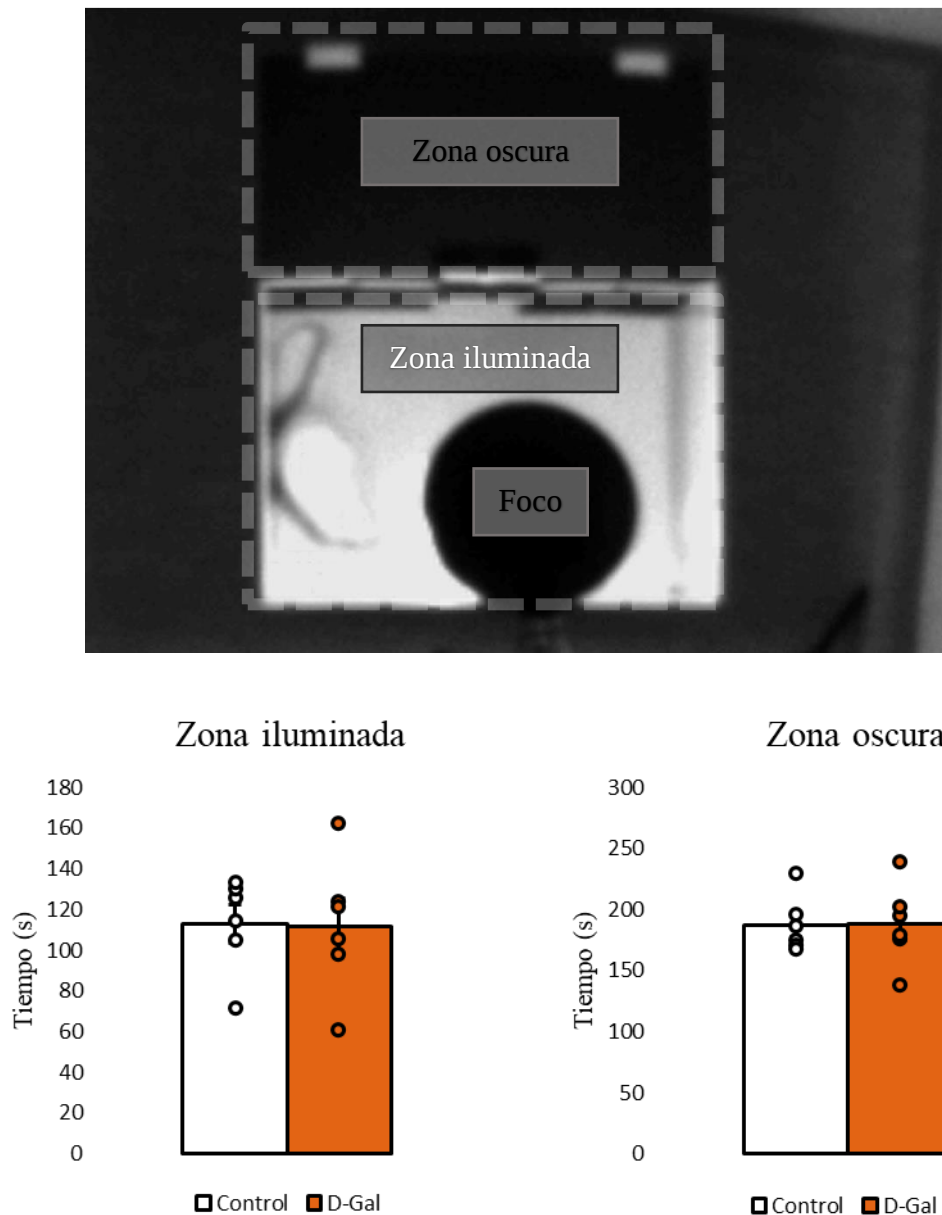


Fig. No. 11. **Prueba de la Caja Luz/Oscuridad.** No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre el grupo tratado y el grupo control. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=6, grupo experimental n=6.

1.5 Nado forzado

La prueba de Nado Forzado evalúa el comportamiento relacionado con la desesperanza. En la figura No. 12 se muestran los resultados del tiempo móvil e inmóvil de los animales durante los cinco minutos que duró la prueba. Este análisis permite observar posibles signos de desesperanza o conducta depresiva en los grupos experimentales.

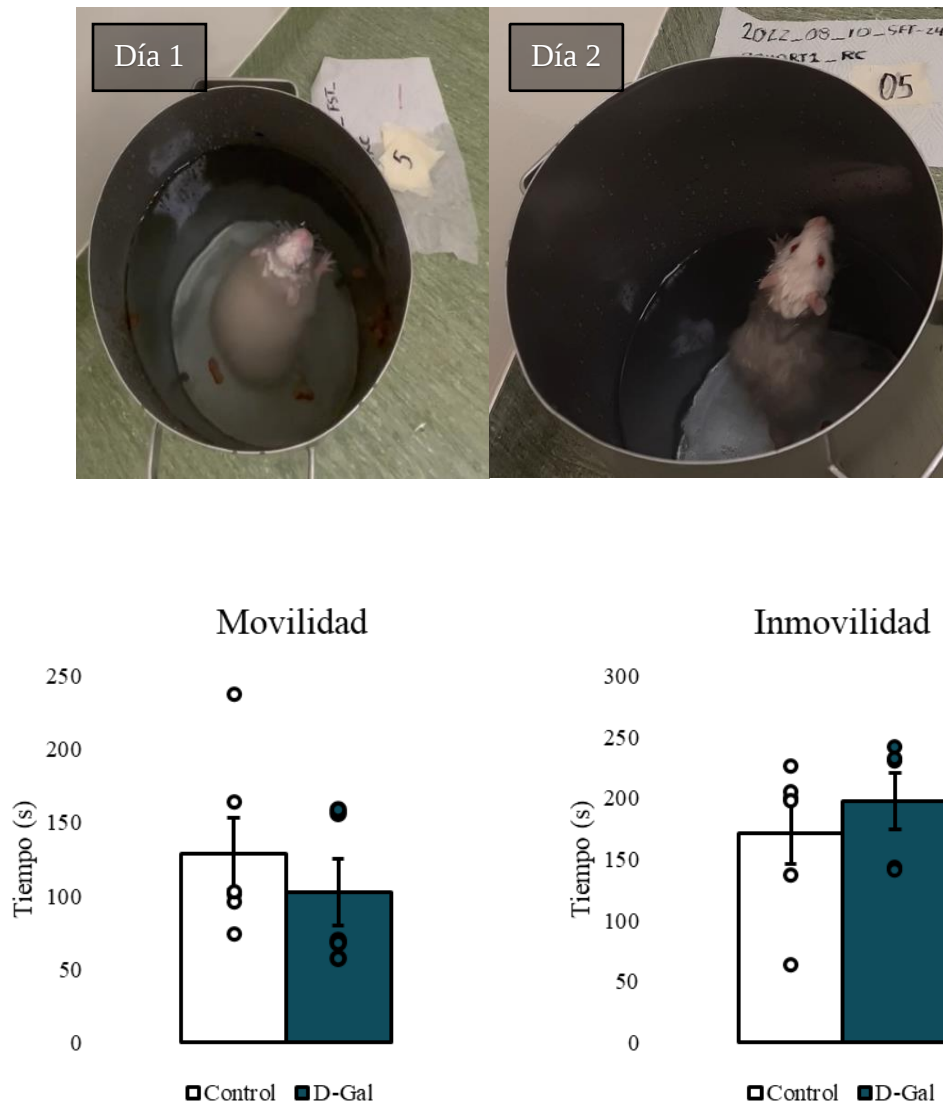


Fig. No. 12. **Prueba de Nado Forzado.** Se muestran los resultados del tiempo móvil e inmóvil que pasaron los animales en el nado forzado durante cinco minutos. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$). Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=6, grupo experimental n=5.

1.6 Preferencia por la sacarosa

La prueba de la preferencia por la sacarosa mide el placer o anhedonia (pérdida de interés por cosas placenteras). Los resultados presentados en la figura No. 13 sugieren que los animales mostraron una preferencia por la sacarosa, descartando así cualquier indicio de anhedonia en ambos grupos.

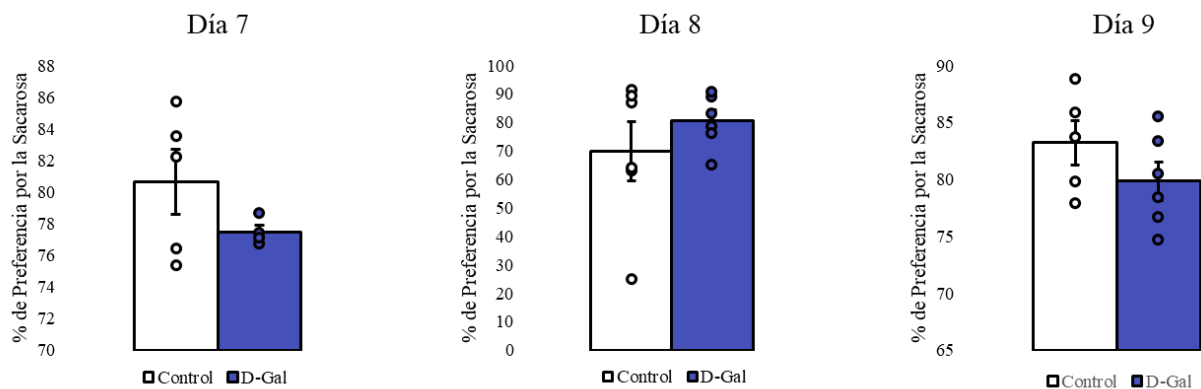


Fig. No. 13. **Prueba de la Preferencia por la Sacarosa.** Los animales no mostraron una preferencia marcada por la sacarosa ni el en día 7, 8 y 9 lo que descarta cualquier indicio de anhedonia ($p>0.05$). Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=6, grupo experimental n=6.

2. Caracterización Morfológica

2.1. NeuN

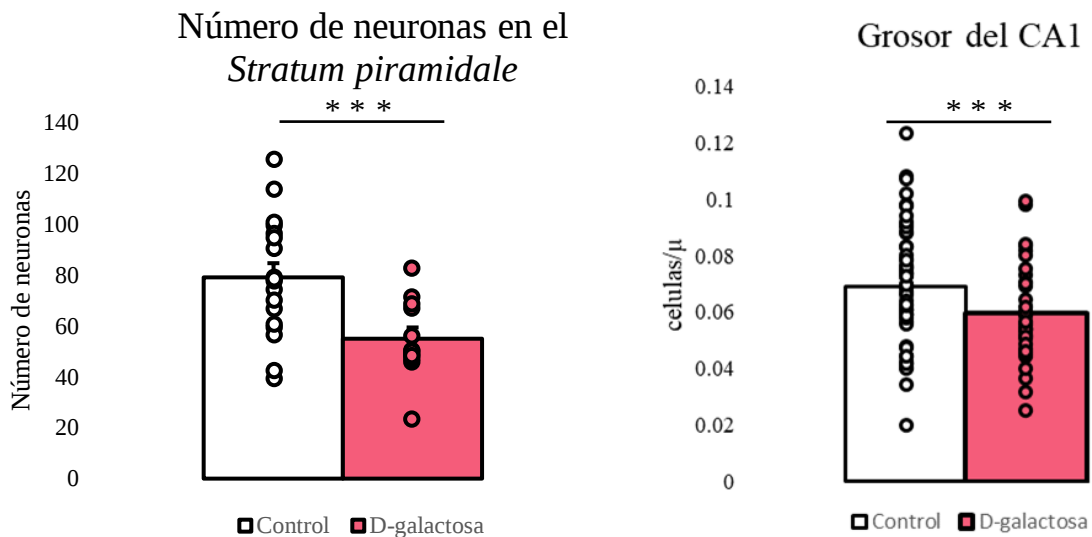
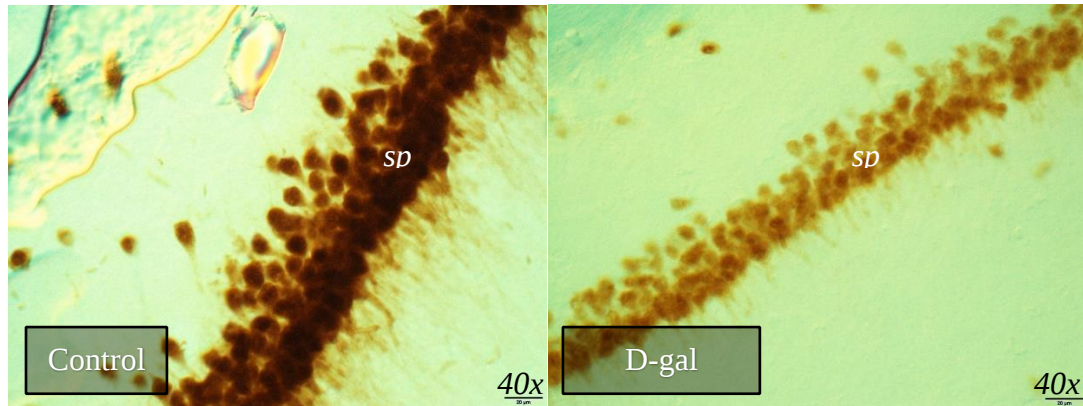


Fig. No 14. **Células neuronales en el CA1 del hipocampo.** Se encontró una reducción significativa de la población neuronal ($p < 0.001$) y del grosor ($p < 0.008$) en los grupos tratados con D-Gal en comparación con el grupo control. En las imágenes superiores se puede ver como el control tiene un mayor grosor de CA1, que el grupo tratado con D-gal. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=54, grupo experimental n=36.

2.2 GFAP

La figura No. 15 muestra un aumento significativo ($p=0.02$) en la **densidad de astrocitos** en el SO del hipocampo de los animales tratados con D-Gal. Este resultado sugiere una posible respuesta astrocítica a los procesos neurodegenerativos en el grupo experimental.

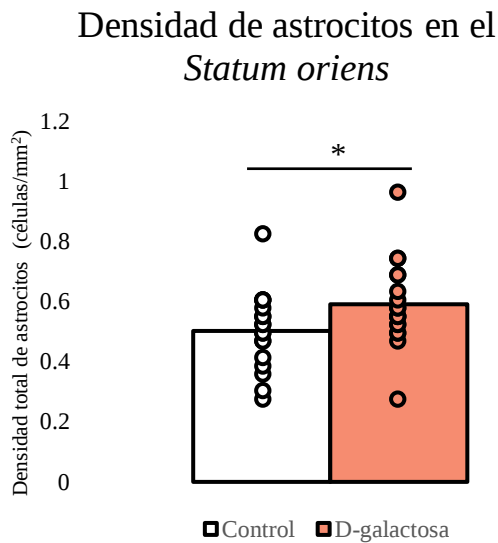
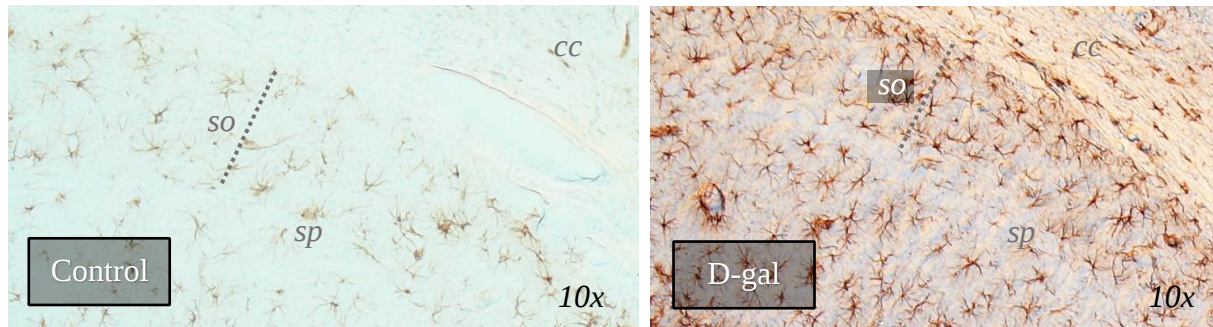


Fig. No 15. **Densidad de Astrocitos en el hipocampo.** Existe un aumento significativo ($p=0.02$) de astrocitos en el so del hipocampo del grupo tratado con D-Gal. En las imágenes superiores el grupo tratado con D-gal presenta un mayor número de astrocitos que el grupo control. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=6, grupo experimental n=6.

2.2 IBA1

En la figura No. 16 se evalúa la densidad de microglías en el so del hipocampo. No se encontraron diferencias significativas ($p=0.15$) en la cantidad de microglías entre el grupo tratado con D-Gal y el grupo control, lo que sugiere que no hubo una respuesta microglial notable en esta región.

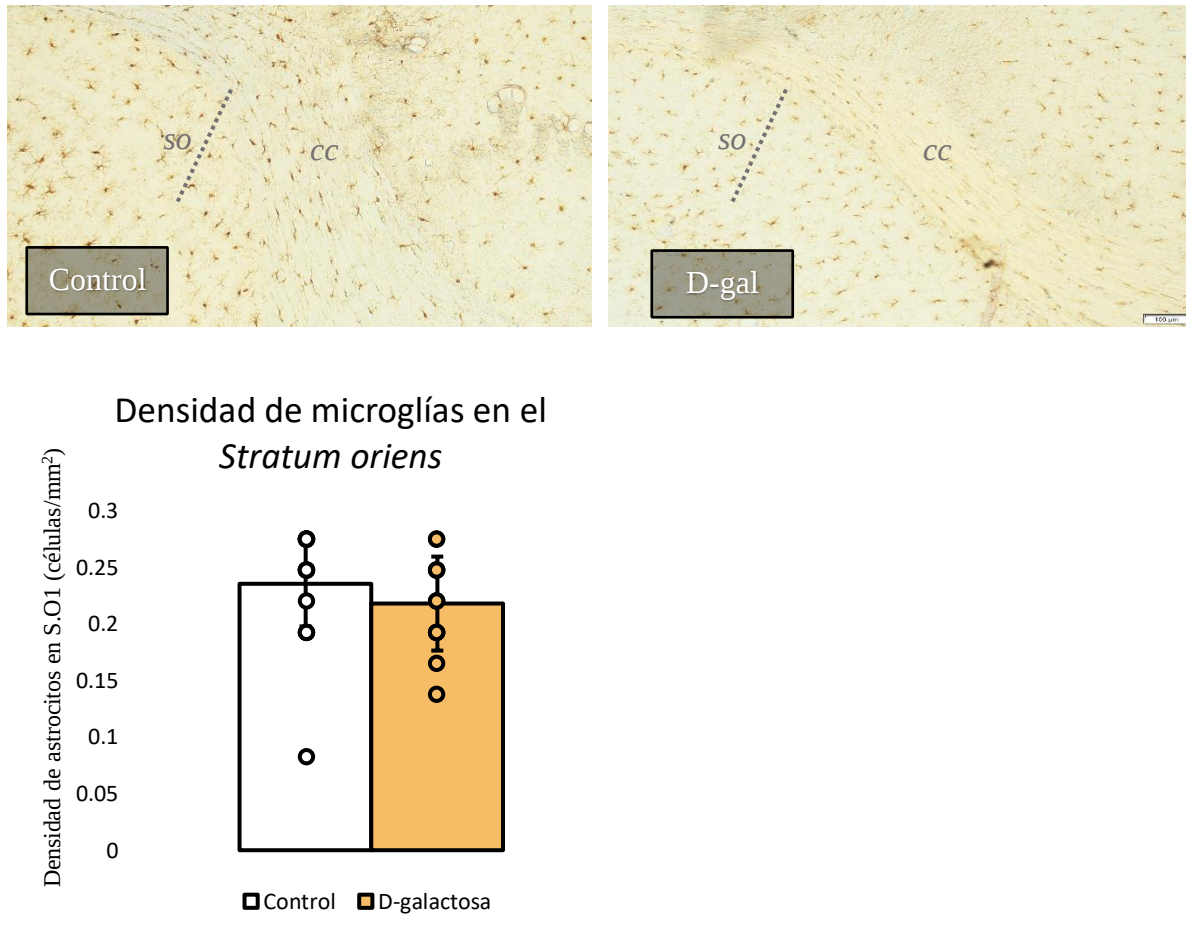


Fig. No. 16. **Densidad de microglías en el hipocampo.** No encontramos diferencias significativas ($p>0.05$) para la densidad de microglías en el SO entre el grupo control y tratamiento. En las imágenes superiores encontramos igual números de microglías para ambos grupos. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=54, grupo experimental n=45.

3. Caracterización sináptica

3.1. PSD95

PSD95 (SAP-90 o DLG4) es una proteína de andamiaje que se encuentra en la densidad postsináptica de las sinapsis excitatorias. Se une de manera directa o indirecta con los receptores NMDA y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), canales de potasio y proteínas de señalización. Su disminución está asociada con alteraciones en la plasticidad sináptica, que es crucial para los procesos de potenciación a largo plazo, el aprendizaje y la memoria. Se ha observada disminuida en pacientes con la EA y en modelos de EA en ratones (Kivisäkk et al., 2022).

Los resultados de esta investigación indicaron que tanto el grupo control como el grupo experimental conservaron cantidades similares de punta de **PSD95** ($p=0.9$), sugiriendo que el tratamiento no afectó la densidad sináptica en la región analizada.

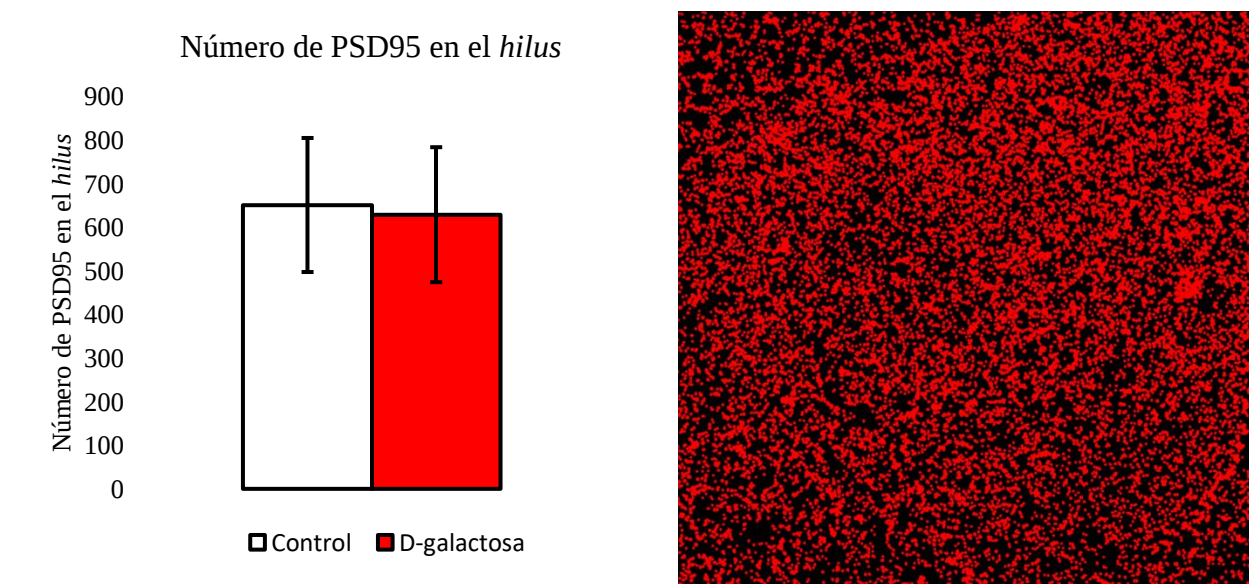


Fig. No. 17. **Punta de PSD95 en el hilus del hipocampo.** No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el grupo control en comparación con el grupo que recibió el tratamiento. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=16, grupo experimental n=18.

3.2 Sinapsina I

La Sinapsina I es una proteína que se encuentra en la superficie citoplasmática de las vesículas sinápticas. Esta proteína es crucial para regular la dinámica de las vesículas sinápticas en las terminales presinápticas. En condiciones de reposo, la Sinapsina I agrupa las vesículas en un reservorio al interactuar con los fosfolípidos y el citoesqueleto de F-actina. Cuando la neurona es estimulada, la Sinapsina I se fosforila en la serina 9, lo que provoca la liberación de las vesículas hacia el espacio sináptico. Después del estímulo, la Sinapsina I se desfosforila y vuelve a agrupar las vesículas en el botón sináptico, permitiendo su reciclaje. En pacientes con la EA, se ha observado una disminución en su expresión, lo cual se asocia con disfunción sináptica (Meng et al., 2022). El análisis muestra un aumento de Sinapsina I en el grupo tratado con D-Gal ($p=0.2$) con respecto al control. Sin embargo, no se encontraron significancias estadísticas.

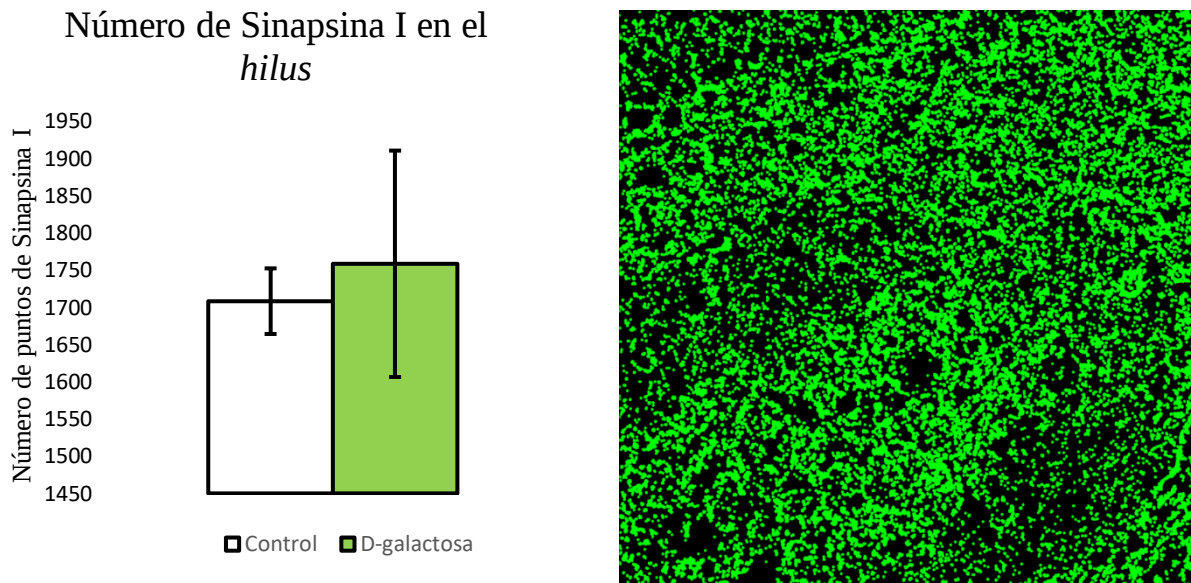


Fig. No 18. **Número de puncta en el hilus del hipocampo.** Existe un aumento de Sinapsina I en el grupo tratado con D-gal, pero sin significancia ($p>0.05$) con respecto al control. Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=13, grupo experimental n=15.

3.3 Colocalización

La colocalización se define como la presencia simultánea y distribución conjunta de dos sondas (molécula fluorescente que se puede utilizar para estudiar la proximidad de dos proteínas en una célula) o marcadores en una misma área espacial. Este concepto incluye dos componentes: la co-ocurrencia, que es la simple superposición espacial de los marcadores, y la correlación, en la que no solo se superponen, sino que además se distribuyen de manera proporcional entre y dentro de las estructuras (Dunn et al., 2011). La identificación de sinapsis químicas a partir de datos de imágenes es un desafío único. Tradicionalmente se identificaban utilizando microscopía electrónica asistida por computadoras, pero ahora es posible identificarlas utilizando microscopía de fluorescencia. Para hallar estos componentes utilizando este tipo de microscopía, es necesario la presencia de anticuerpos que reconozcan de manera selectiva las proteínas específicas de las neuronas presinápticas y las postsinápticas (Rebollo et al., 2019)

En nuestros resultados, la colocalización sináptica de Sinapsina I (en vesículas presinápticas) y PSD95 (en la densidad postsináptica) en el hilio del hipocampo se representan en la Fig.19. Las flechas indican los puntos solapados que representan las sinapsis activas (puncta en amarillo).

Se encontró una disminución no significativa en la cantidad de puncta ($p < 0.08$) en el grupo tratado con D-gal, lo que sugiere una reducción de la actividad sináptica en este grupo debido a la sustancia administrada.

Este hallazgo indicaría una potencial alteración en la interacción y proximidad funcional entre proteínas pre y postsinápticas, lo cual podría estar asociado a un deterioro en la conectividad sináptica. Dicha disminución podría tener implicaciones en la plasticidad y en la eficacia de la transmisión sináptica, aspectos relevantes para comprender los mecanismos subyacentes de la EA y los efectos del envejecimiento acelerado inducido por la D-gal.

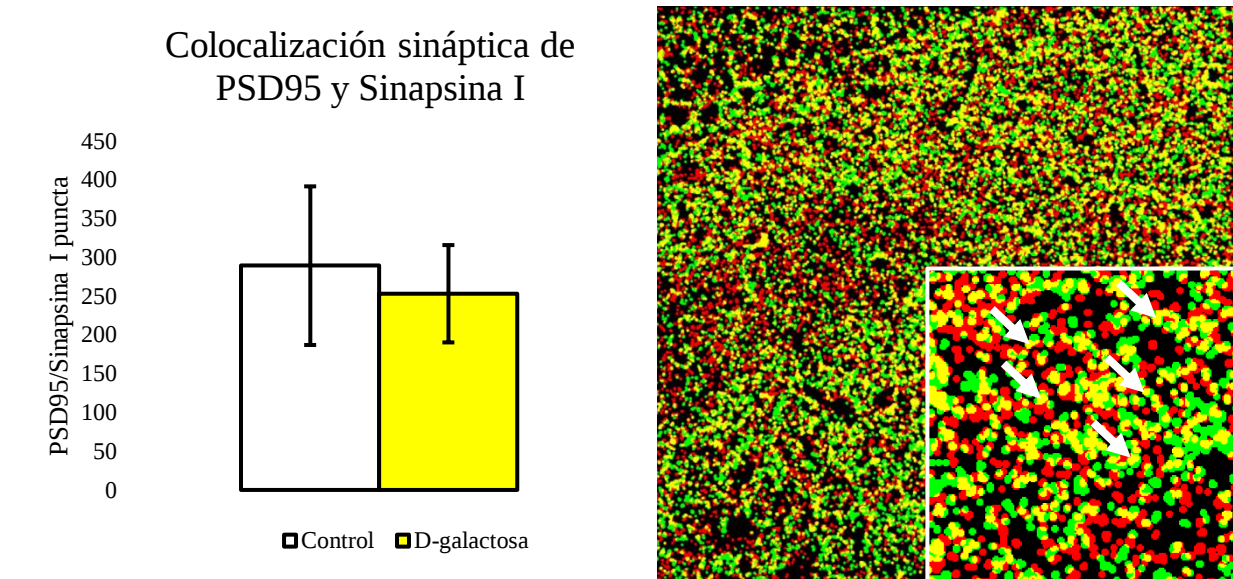


Fig. No 19. **Colocalización sináptica de PSD95 y Sinapsina I.** La identificación de las sinapsis se realizó superponiendo los puntos encontrados en ambas imágenes. Las flechas indican los puntos solapados (puncta) que representan las sinapsis en color amarillo. Encontramos una disminución ($p < 0.08$) de la cantidad de puncta en el grupo tratado con D-Gal ($n=17$) con respecto al control ($n=16$). Los valores son medias $\pm$ error estándar; grupo control=16, grupo experimental $n=17$.

DISCUSIÓN

1. Evaluación de trastornos neuropsiquiátricos

1.1 Prueba de campo abierto

El campo abierto es una de las pruebas etológicas más popularmente utilizadas para evaluar comportamientos relacionados con los trastornos de ansiedad. En esta prueba a los animales se les permite explorar libremente en un ambiente desconocido y delimitado por amplias paredes (Pruet et al., 2003). En estos escenarios, los roedores que evitan el centro del campo abierto muestran un comportamiento conocido como tigmotaxis (movimiento de orientación en respuesta a la estimulación obtenida por un cuerpo sólido), que sirve como mecanismo de evasión de depredadores y se manifiesta especialmente cuando están bajo estrés. Este comportamiento puede medirse objetivamente mediante la prueba de campo abierto y se caracteriza porque los roedores buscan permanecer cerca de las paredes y evitar el centro expuesto del área abierta, mostrando una menor disposición para explorar el entorno nuevo en comparación con un animal menos estresado. Estas pruebas se utilizan comúnmente en la investigación de trastornos psiquiátricos, especialmente la ansiedad (Zhang et al., 2023).

En esta prueba nuestros resultados mostraron que las ratas tratadas con D-Gal pasaron menos tiempo en el centro absoluto del campo abierto (Fig. No. 8) en comparación con el control indicando una tendencia a evitar la zona central. Estas ratas prefirieron mantenerse en las áreas laterales del laberinto, lo que sugiere mayores niveles de ansiedad en comparación con los grupos control.

Krzysztoforska et al. (2019) evidenciaron que la administración oral con D-Gal causa alteraciones en los neurotransmisores que regulan las vías serotoninérgicas y dopaminérgicas de la corteza y del hipocampo. Aunque en nuestro modelo utilizamos la administración intraperitoneal, creemos que estas alteraciones pudieron influir en las mismas vías y afectar los circuitos que regulan los procesos de ansiedad debido a que en nuestro modelo, D-Gal entra directamente en la cavidad intraperitoneal y es absorbida más rápidamente en el torrente sanguíneo, a diferencia de la administración oral que es metabolizada inicialmente en el hígado.

1.2 Prueba de brazos elevados en cruz

Según Walf & Frye (2007) El brazo elevado en cruz es un método ampliamente validado para evaluar los efectos ansiolíticos de agentes farmacológicos y hormonas esteroideas, así como para identificar las regiones cerebrales y mecanismos relacionados con la conducta ansiosa.

Las ratas tratadas con D-Gal pasaron más tiempo en el centro del laberinto (Fig. No. 9), sugiriendo menores niveles de ansiedad, pero reforzando una posible dificultad en la toma de decisiones ocasionada por el posible estrés oxidativo y daño neuronal, que posiblemente se pueda extender en áreas de la corteza prefrontal y el hipocampo, ya que nuestros resultados en el microscopio de campo claro mostraron una reducción significativa de neuronas ($p < 0.001$) en la región del CA1. Estas regiones están involucradas en la toma de decisiones y la evaluación del riesgo. Cuando su funcionamiento está comprometido, puede resultar difícil para el animal decidir entre explorar los brazos abiertos o cerrados.

Estudios previos (Liston et al., 2009) han demostrado que el estrés crónico puede afectar negativamente la conectividad y la función de la corteza prefrontal, lo que lleva a déficits en tareas de atención y control cognitivo. Estos hallazgos, observados tanto en estudios humanos como en modelos animales, muestran que el daño en la corteza prefrontal por estrés prolongado es reversible, pero también implica una alteración en la plasticidad y la capacidad de respuesta cognitiva

1.3 Prueba de preferencia por la sacarosa

La anhedonia es la disminución en la capacidad de disfrutar de actividades cotidianas que antes resultaban placenteras. Estudios previos sugieren que la anhedonia podría ser un signo preclínico de deterioro cognitivo o un factor de riesgo psicopatológico de demencia. Sin embargo, la asociación entre síntomas relacionados con la depresión y la EA aún no está clara. Además, la variabilidad en la definición de anhedonia en diferentes estudios ha llevado a resultados inconsistentes (Vaquero-Puyuelo et al., 2021). En las investigaciones realizadas por C. Wang et al. (2012), se describe un experimento basado en un modelo de estrés crónico leve (ECL) en ratas, diseñado para investigar cómo el estrés induce cambios oxidativos en el cerebro y su posible relación con la anhedonia, evaluada mediante la disminución en la preferencia por sacarosa. En sus resultados, encontraron que no todos los animales expuestos al estrés desarrollaron anhedonia. De hecho, las ratas se dividieron en dos grupos: ECL-sensibles, que mostraron una clara reducción

en el consumo de sacarosa (indicador de anhedonia), y ECL-resilientes, que mantuvieron un consumo de sacarosa similar al de los controles. Ambos grupos, sin embargo, presentaron un aumento en el estrés oxidativo en varias regiones del cerebro, aunque el daño oxidativo fue mayor en las ratas ECL-sensibles.

En nuestro modelo, no se reportaron diferencias significativas en el consumo de sacarosa en los 3 días de prueba entre el grupo tratado y el grupo control (Fig. No. 13). Esta ausencia de anhedonia sugiere que, aunque el tratamiento con D-Gal induce un estado de estrés oxidativo, este factor por sí solo no es suficiente para provocar la pérdida de interés en las ratas por actividades placenteras. Sugerimos que el desarrollo de la anhedonia requiera de la activación de rutas adicionales, como alteraciones en el sistema dopaminérgico o serotoninérgico, o una mayor implicación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (Scheggi et al., 2018).

2. Caracterización Morfológica

2.1 NeuN

El aumento de astrocitos activados puede propiciar la liberación de moléculas tóxicas como citoquinas proinflamatorias, un exceso de glutamato (excitotoxicidad) y ROS que pueden dañar directamente a las células nerviosas. Esto es consistente con nuestros hallazgos en cuanto a la disminución de la población neuronal ($p < 0.001$) y la reducción del grosor del hipocampo ($p < 0.008$) en el CA1 del hipocampo que evidencian el desarrollo de procesos neurodegenerativos en el grupo tratado con D-Gal (Fig. No. 14).

Los resultados sugieren que la acumulación de ROS aumentó el daño por estrés oxidativo en el hipocampo, favoreciendo la disfunción mitocondrial. Esto pudo provocar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, liberando moléculas proapoptóticas, como el citocromo c, que activan las vías de la apoptosis. Además, este ambiente oxidativo favorece la activación de microglías y astrocitos, lo que aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias, exacerbando la neuroinflamación. Este proceso inflamatorio crónico puede causar daño adicional a las neuronas y a la red sináptica, agravando la pérdida neuronal a lo largo del CA1 del hipocampo. (Clemente-Suárez et al., 2023)

La neurodegeneración del CA1 del hipocampo es contrastante con los hallazgos reportados por Firdaus et al. (2020), quienes emplearon tinción con hematoxilina para evaluar la morfología

neuronal en un modelo con D-Gal. En su estudio, se documentó una pérdida significativa de neuronas acompañada de la desorganización en la estructura del CA1, caracterizada por alteraciones tanto nucleares como citoplasmáticas, lo que sugirió procesos de muerte celular.

Ullah et al. (2015b) en su modelo de senescencia en ratas con D-Gal (i.p. 120 mg/kg) demostraron que el grupo tratado con D-Gal, mostró múltiples efectos relacionados con la neurodegeneración y la neuroinflamación en el hipocampo. Se encontró un aumento significativo de 8-oxoguanina en el CA1, lo que indica daño por estrés oxidativo. Además, se registró una elevación en la expresión de p-JNK y mediadores proinflamatorios como COX-2, NOS2, TNF- α e IL-1 β , lo que sugiere una activación de procesos neuroinflamatorios. También se encontraron elevados los niveles de BAX/BCL2, el citocromo C, y las caspasas 3 y 9, PARP-1 clivado, todos ellos marcadores asociados con la activación de la vía apoptótica. Además, se observó una disminución en la cantidad de neuronas evaluadas con tinción de violeta de cresilo y una reducción en la expresión de PSD95, lo que refleja sinaptopatía y pérdida neuronal.

2.2 GFAP e IBA1

Los resultados de Rehman et al. (2017) en un modelo de D-gal, indicaron un aumento en el número de GFAP activado en las regiones de la corteza y el hipocampo (CA1 y giro dentado) en ratas tratadas con D-Gal en comparación con las ratas control. También reportaron un aumento en la intensidad de IBA1 lo que indicó un aumento del nivel de microglías en las ratas tratadas con D-Gal en comparación con las ratas tratadas con solución salina normal.

En los resultados de los ensayos inmunofluorescencia de Wang et al. (2024) mostraron células positivas de IBA1 en el hipocampo y la corteza en las ratas tratadas con D-Gal, en comparación con el grupo control. También encontraron un aumento en la expresión de GFAP en el hipocampo y la corteza del grupo tratado con D-Gal en comparación con el grupo control, demostrando que la D-Gal inicia procesos neuroinflamatorios.

Nuestros resultados mostraron un aumento significativo en el número de astrocitos ($p < 0.05$) en el grupo tratado con D-Gal respecto al control (Fig. No. 15). No encontramos diferencias con el número de microglías en ambos grupos (Fig. No. 16). Consideramos que la metodología empleada para realizar el conteo de microglías pudo haber influido en los resultados y generado un falso negativo. Las microglías, a diferencia de los astrocitos, son células móviles y pueden desplazarse en respuesta a estímulos, lo que sugiere que el conteo limitado a lo largo del CA1 podría no haber

sido la mejor estrategia para evaluar su proliferación de manera precisa. Esta movilidad celular puede haber dificultado una cuantificación exacta y llevado a una subestimación o variabilidad en el número real de microglías.

3. Caracterización sináptica

El BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) es un nucleótido sintético utilizado para identificar la generación de nuevas neuronas, ya que se incorpora en el ADN de las células durante la fase S del ciclo celular, permitiendo la identificación de células en proceso de división. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en estudios de neurogénesis para evaluar la proliferación celular y el desarrollo neuronal (Martí-Clúa, 2024). Los ensayos realizados por An et al. (2018) en un modelo de envejecimiento acelerado inducido por D-Gal (120 mg/kg, s.c.) revelaron una disminución significativa en el número de células BrdU-positivas en el hilio del hipocampo. Estos hallazgos sugieren que la administración con D-Gal afecta negativamente la capacidad del hipocampo para generar nuevas neuronas, probablemente debido a los efectos perjudiciales del estrés oxidativo sobre la neurogénesis.

En nuestro modelo, no encontramos diferencias significativas en las colocalizaciones (Fig. No. 19) de PSD95 (Fig. No 17) y Sinapsina I (Fig. No 18) en el hilio del giro dentado ni tampoco en los marcadores individuales sinápticos, por lo que no se puede hablar de una disminución en las conexiones sinápticas utilizando el modelo o metodologías empleadas. Sin embargo, al ser el hilio una zona altamente especializada en la neurogénesis, no descartamos que pueda existir la disminución de las conexiones sinápticas en otras áreas del hipocampo.

CONCLUSIONES

Evaluación de trastornos neuropsiquiátricos:

- ✓ Las ratas tratadas con D-Gal mostraron mayores niveles de ansiedad al evitar el centro del campo abierto, un comportamiento asociado con la tigmotaxis.
- ✓ En la prueba de brazos elevados en cruz, las ratas tratadas con D-Gal pasaron más tiempo en el centro del laberinto, sugiriendo una posible dificultad en la toma de decisiones relacionada con daños en la corteza prefrontal y el hipocampo.
- ✓ No se encontraron diferencias significativas en la prueba de preferencia por la sacarosa, indicando que el estrés oxidativo inducido por D-Gal no fue suficiente para provocar anhedonia en este modelo.
- ✓ Las pruebas de nado forzado e interacción social no revelaron indicios conductuales de depresión en este modelo, lo que sugiere D-Gal no afecta los circuitos asociados a este trastorno neuropsiquiátrico.

Caracterización Morfológica:

- ✓ D-Gal genera efectos neurodegenerativos en el hipocampo, evidenciados por una disminución significativa en la población neuronal y en el grosor del CA1.
- ✓ El aumento en astrocitos activados sugiere la liberación de citoquinas proinflamatorias, ROS y excitotoxicidad, exacerbando la neuroinflamación y contribuyendo a la pérdida neuronal.

Caracterización Sináptica:

- ✓ D-gal no afecta las sinapsis en el hilio del hipocampo de ratas.

LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES

1. No se pudo controlar el grosor de los tejidos, que consistentemente debió ser de 50 μm . Las diferencias en grosor las pudimos confirmar haciendo los análisis *z-stacks* en el microscopio confocal. Esto pudo deberse a las variaciones de temperatura a la hora de utilizar el hielo seco y al desgaste de la cuchilla. Recomendamos utilizar protocolos que involucren cortes con parafina, ya que estos son más fáciles de manejar, no dependen de la temperatura y además pueden hacer cortes más finos para realizar un mejor análisis de las proteínas sinápticas.
2. No controlamos las variables del ciclo estral de las ratas hembra por lo que sugerimos que el estudio en hembras pueda ser realizado con procedimientos de ovariectomía previos.
3. Las altas temperaturas (100°C) que usamos para hacer posible la colocalización maltrató los tejidos, haciendo difícil su estudio, por lo que sugerimos tratar las secciones con un calor más bajo (60°C) y dejarlas incubando durante 24 horas.
4. La prueba de interacción social no tuvo una barrera divisoria entre el animal nuevo y el familiar, por lo que pudo haber afectado los resultados de esa prueba en particular.
5. Los resultados obtenidos con este diseño experimental pudieron haber afectado la caracterización morfológica ya que luego de la última administración con D-Gal, los animales atravesaron el análisis conductual durante 3 semanas. Este tiempo pudo haber sido suficiente para que se reestableciera el balance entre el sistema oxidativo y las especies reactivas de oxígeno y así disminuir los estados reactivos de las glías a la hora de hacer las pruebas *ex vivo*. Recomendamos para cualquier análisis *ex vivo* que los animales sean eutanasiados al final de las administraciones con D-Gal.
6. Los métodos de eutanasia también pudieron haber afectado la variabilidad, debido a que algunos cerebros fueron perfundidos y otros fueron obtenidos en fresco. Sugerimos utilizar un único método de eutanasia.
7. Las imágenes tomadas con cromógeno representaron un reto para su análisis utilizando el software *ImageJ* debido a la inconsistencia en color y resolución tomada entre diferentes imágenes. Esto fue difícil porque el microscopio utilizado para la toma de estas imágenes es compartido y dificulta la consistencia en color y resolución de las imágenes. Recomendamos utilizar protocolos de fluorescencia, ya que las variables en este protocolo son mayormente controlables.

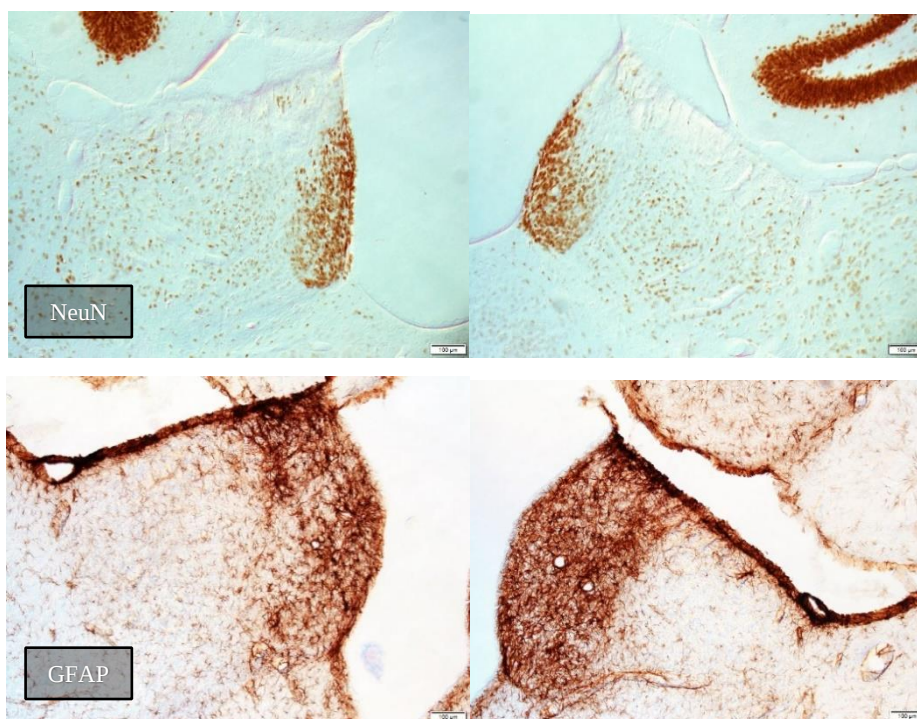
FUTUROS ESTUDIOS

Análisis de Sholl

Sugerimos realizar un análisis de Sholl, técnica cuantitativa ampliamente utilizada para evaluar la extensión y la complejidad de los procesos celulares de las neuronas y glías, que permitirá evaluar si existe una activación de microglías y astrocitos. Los estudios de Zappa Villar et al. (2018) muestran cómo debería realizarse este análisis.

Habénula

La habénula lateral (LHb) integra información de circuitos relacionados con la memoria, el estrés, la motivación y la recompensa, los cuales son esenciales para la toma de decisiones y la supervivencia. Su disfunción está relacionada con trastornos neuropsiquiátricos, especialmente aquellos asociados con el estrés, la motivación y la regulación emocional, como la depresión y otros trastornos relacionados con el estrés (Baker et al., 2022).



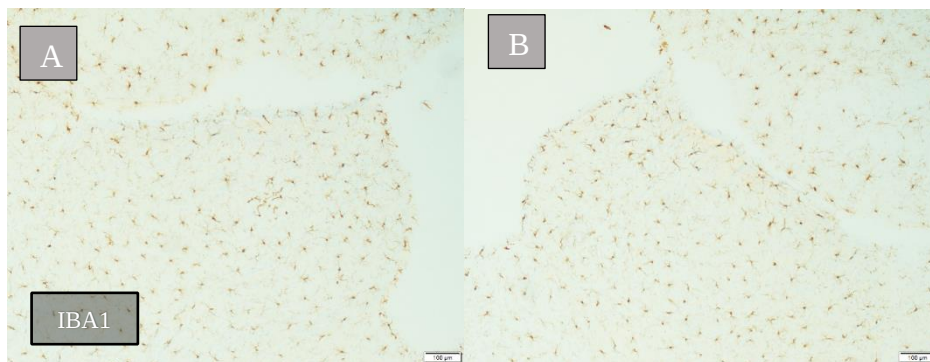


Fig. No. 20. **Habénula teñida con NeuN y GFAP e IBA1.** Los hallazgos obtenidos de la habénula lateral son importantes para el estudio de trastornos neuropsiquiátricos, ya que está implicada en la regulación de circuitos emocionales, de recompensa y de estrés, que son alterados en condiciones como la depresión, la ansiedad y el trastorno por estrés postraumático. (Baker et al., 2022). A: Habenula izquierda. B: Habenula derecha.

Amígdala

Estudios clínicos y en animales muestran que la exposición al estrés agudo o crónico induce cambios morfológicos y funcionales en los núcleos de la amígdala. La hiperactividad de la amígdala en respuesta a estímulos emocionales puede influir en la susceptibilidad individual a desarrollar trastornos de ansiedad. Las personas con alta ansiedad son más propensas a procesar información emocional a través de una amígdala hiperactiva, lo que agrava su vulnerabilidad (Zhang et al., 2018)

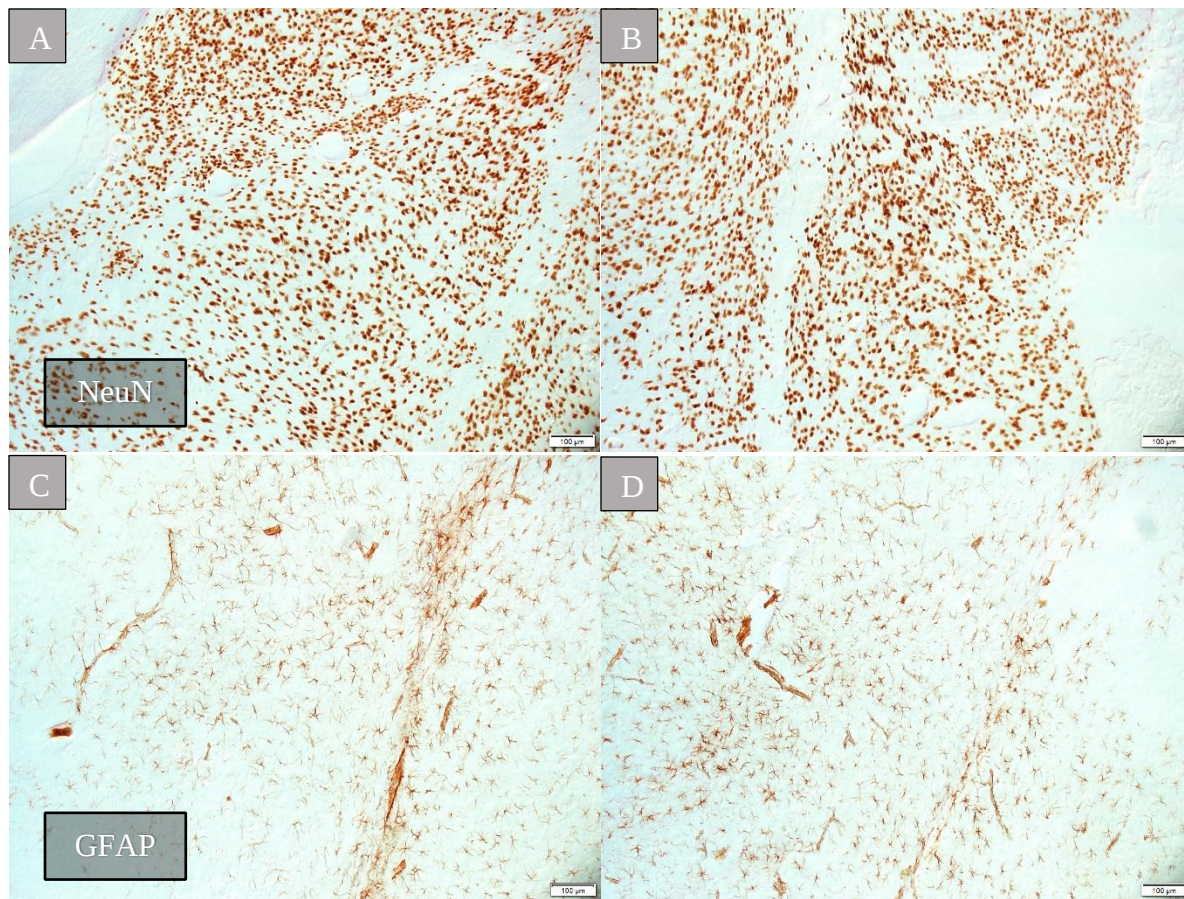


Fig. No. 21. **Amígdalas teñidas con NeuN y GFAP.** Se muestra una sección de las amígdalas cerebrales teñida con dos marcadores específicos: NeuN, que identifica los núcleos de las neuronas, y GFAP, un marcador que resalta la presencia y morfología de astrocitos reactivos.(Luijck et al., 2024; Mullen et al., 1992). A: amígdala izquierda. B: amígdala derecha. C: amígdala izquierda. D: amígdala derecha.

Fenotipo de las Microglías

Las microglías tienen la capacidad de adoptar diferentes fenotipos (o estados de activación) que pueden tener efectos protectores o perjudiciales. Cuantificar los diferentes fenotipos de microglías (reposo, activado, senescente) permite entender cómo responden a distintos estímulos, como infecciones, lesiones o procesos neurodegenerativos (Wendimu & Hooks, 2022)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2024 Alzheimer's disease facts and figures. (2024). *Alzheimer's and Dementia*, 20(5), 3708–3821. <https://doi.org/10.1002/alz.13809>
- Alzheimer's Statistics* | *Alzheimers.net*. (n.d.). Retrieved July 28, 2022, from <https://www.alzheimers.net/alzheimers-statistics>
- Amada, N., Kakumoto, Y., Futamura, T., & Maeda, K. (2022). Prenatal methotrexate injection increases behaviors possibly associated with depression and/or autism in rat offspring; A new animal model for mental disorder, based on folate metabolism deficit during pregnancy. *Neuropsychopharmacology Reports, February*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/npr2.12255>
- An, L., Sun, Y., Zhang, W., Huang, X., Xue, R., Zhang, Y., & Wang, Y. (2018). Walnut diets up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and age-related cognitive dysfunction in d-galactose induced aged rats. *Food and Function*, 9(9), 4755–4762. <https://doi.org/10.1039/c8fo00702k>
- Andrés Juan, C., Manuel Pérez de la Lastra, J., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E., & Reinbothe, S. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0536-x>
- Aydın, A. F., Küçükgergin, C., Çoban, J., Doğan-Ekici, I., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M., & Koçak-Toker, N. (2018). Carnosine prevents testicular oxidative stress and advanced glycation end product formation in D-galactose-induced aged rats. *Andrologia*, 50(3), 1–9. <https://doi.org/10.1111/and.12939>
- Bailey, J., Oliveri, A., & Levin, E. (2013). Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/ejn.12169>.Autophagy
- Baker, P. M., Mathis, V., Lecourtier, L., Simmons, S. C., Nugent, F. S., Hill, S., & Mizumori, S. J. Y. (2022). Lateral Habenula Beyond Avoidance: Roles in Stress, Memory, and Decision-Making With Implications for Psychiatric Disorders. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 16(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2022.826475>
- Banji, O. J. F., Banji, D., & Ch, K. (2014a). Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.020>

- Banji, O. J. F., Banji, D., & Ch, K. (2014b). Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.020>
- Baranova, A., Zhao, Q., Cao, H., Chandhoke, V., & Zhang, F. (2024). Causal influences of neuropsychiatric disorders on Alzheimer’s disease. *Translational Psychiatry*, 14(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02822-1>
- Behl, C. (2000). Apoptosis and Alzheimer’s disease. *Journal of Neural Transmission*, 107(11), 1325–1344. <https://doi.org/10.1007/s007020070021>
- Bhattacharya, R., Alam, M. R., Kamal, M. A., Seo, K. J., & Singh, L. R. (2023). AGE-RAGE axis culminates into multiple pathogenic processes: a central road to neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16(May). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1155175>
- Botto, R., Callai, N., Cermelli, A., Causarano, L., & Rainero, I. (2022). Anxiety and depression in Alzheimer’s disease: a systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline. *Neurological Sciences*, 43(7), 4107–4124. <https://doi.org/10.1007/s10072-022-06068-x>
- Britton, G. B., & Bethancourt, J. A. (2009). Characterization of anxiety-related responses in male rats following prolonged exposure to therapeutic doses of oral methylphenidate. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93(4), 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.06.007>
- Büki, A., Bohár, Z., Kekesi, G., Vécsei, L., & Horvath, G. (2022). Wisket rat model of schizophrenia: Impaired motivation and, altered brain structure, but no anhedonia. *Physiology and Behavior*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113651>
- C. Lyketsos, O. Lopez, B., & Jones et al. (2002). Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: Results from the cardiovascular health study. *Jama*, 288(12), 1475–1483. <https://doi.org/10.1001/jama.288.12.1475>
- Cai, Z., Hussain, M. D., & Yan, L. J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer’s disease. *International Journal of Neuroscience*, 124(5), 307–321. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.833510>
- Carreiras, M., Mendes, E., Perry, M., Francisco, A., & Marco-Contelles, J. (2014). The Multifactorial Nature of Alzheimer’s Disease for Developing Potential Therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(15), 1745–1770. <https://doi.org/10.2174/15680266113139990135>
- Chen, P., Guarino, P. D., Dysken, M. W., Pallaki, M., Asthana, S., Llorente, M. D., Love, S., Vertrees, J. E., Schellenberg, G. D., & Sano, M. (2018). Neuropsychiatric Symptoms and Caregiver Burden in Individuals With Alzheimer’s Disease: The TEAM-AD VA Cooperative Study. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 31(4), 177–185. <https://doi.org/10.1177/0891988718783897>

- Chogtu, B., Arivazhahan, A., Kiran Kunder, S., Tilak, A., Sori, R., & Tripathy, A. (2018a). Evaluation of acute and chronic effects of d-galactose on memory and learning in wistar rats. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 16(2), 153–160. <https://doi.org/10.9758/cpn.2018.16.2.153>
- Chogtu, B., Arivazhahan, A., Kiran Kunder, S., Tilak, A., Sori, R., & Tripathy, A. (2018b). Evaluation of acute and chronic effects of d-galactose on memory and learning in wistar rats. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 16(2), 153–160. <https://doi.org/10.9758/cpn.2018.16.2.153>
- Clemente-Suárez, V. J., Redondo-Flórez, L., Beltrán-Velasco, A. I., Ramos-Campo, D. J., Belinchón-deMiguel, P., Martínez-Guardado, I., Dalamitros, A. A., Yáñez-Sepúlveda, R., Martín-Rodríguez, A., & Tornero-Aguilera, J. F. (2023). Mitochondria and Brain Disease: A Comprehensive Review of Pathological Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Biomedicines*, 11(9), 1–52. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11092488>
- Conte, F., van Buuringen, N., Voermans, N. C., & Lefeber, D. J. (2021). Galactose in human metabolism, glycosylation and congenital metabolic diseases: Time for a closer look. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1865(8), 129898. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129898>
- Crews, L., Masliah, E., & Masliah, E. (2010). *Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease*. 15(858), 1–41. <http://hmg.oxfordjournals.org/>
- Denenberg, V. H. (1969). Open-Field Behavior in the Rat: What Does It Mean? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 159(3), 852–859. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1969.tb12983.x>
- Dhage, P. A., Sharbidre, A. A., & Magdum, S. M. (2023). Interlacing the relevance of caspase activation in the onset and progression of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 192(November 2022), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.008>
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 300(4), 723–742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>
- El-Far, A. H., Mohamed, H. H., Elsabagh, D. A., Mohamed, S. A., Noreldin, A. E., Al Jaouni, S. K., & Alsenosy, A. A. (2022). Eugenol and carvacrol attenuate brain d-galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(31), 47436–47447. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18984-8>
- Faradila, F., Rika, S., & Liputo, N. I. (2022). The Effect of Combination Ovariectomy and D-galactose Administration on Alzheimer's Animal Model. *Baghdad Science Journal*, March, 1021–1026. <https://doi.org/10.21123/bsj.2022.5486>
- Feng, L., Sun, J., Xia, L., Shi, Q., Hou, Y., Zhang, L., Li, M., Fan, C., & Sun, B. (2024). Ferroptosis mechanism and Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 19(8), 1741–1750. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.389362>

- Firdaus, Z., Singh, N., Prajapati, S. K., Krishnamurthy, S., & Singh, T. D. (2020). Centella asiatica prevents D-galactose-Induced cognitive deficits, oxidative stress and neurodegeneration in the adult rat brain. *Drug and Chemical Toxicology*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1833907>
- Franke, H., & Illes, P. (2014). Nucleotide signaling in astrogliosis. *Neuroscience Letters*, 565, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.056>
- Gao, J., He, H., Jiang, W., Chang, X., Zhu, L., Luo, F., Zhou, R., Ma, C., & Yan, T. (2015). Salidroside ameliorates cognitive impairment in a d-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 293, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.045>
- García-Alberca, J. M., Lara Muñoz, J. P., & Berthier Torres, M. (2010). [Neuropsychiatric and behavioral symptomatology in Alzheimer disease]. *Actas Espanolas de Psiquiatria*, 38(4), 212–222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21104466>
- Gautam, D., Naik, U. P., Naik, M. U., Yadav, S. K., Chaurasia, R. N., & Dash, D. (2023). Glutamate Receptor Dysregulation and Platelet Glutamate Dynamics in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Insights into Current Medications. *Biomolecules*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/biom13111609>
- Guerreiro, S., Privat, A. L., Bressac, L., & Toulorge, D. (2020). CD38 in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020471>
- Hadzi-Petrushev, N., Stojkovski, V., Mitrov, D., & Mladenov, M. (2014). D-galactose induced inflammation lipid peroxidation and platelet activation in rats. *Cytokine*, 69(1), 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.006>
- Herrmann, N., & Lanctôt, K. L. (2007). Pharmacologic management of neuropsychiatric symptoms of Alzheimer disease. *Canadian Journal of Psychiatry*, 52(10), 630–646. <https://doi.org/10.1177/070674370705201004>
- Huang, W. J., Zhang, X., & Chen, W. W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review). *Biomedical Reports*, 4(5), 519–522. <https://doi.org/10.3892/br.2016.630>
- Ionescu-Tucker, A., & Cotman, C. W. (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 107, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>
- Jeong, J. H., Koo, J. H., Yook, J. S., Cho, J. Y., & Kang, E. B. (2021). Neuroprotective benefits of exercise and MitoQ on memory function, mitochondrial dynamics, oxidative stress, and neuroinflammation in D-galactose-induced aging rats. *Brain Sciences*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/brainsci11020164>
- Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., & Höhn, A. (2021). Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biology*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>

- Kitazawa, M., Yamasaki, T. R., & LaFerla, F. M. (2004). Microglia as a potential bridge between the amyloid β -peptide and tau. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035, 85–103. <https://doi.org/10.1196/annals.1332.006>
- Kivisäkk, P., Carlyle, B. C., Sweeney, T., Quinn, J. P., Ramirez, C. E., Trombetta, B. A., Mendes, M., Brock, M., Rubel, C., Czerkowicz, J., Graham, D., & Arnold, S. E. (2022). Increased levels of the synaptic proteins PSD-95, SNAP-25, and neurogranin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13195-022-01002-x>
- Krzysztoforska, K., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Pyrzanowska, J., Joniec-Maciejak, I., Mirowska-Guzel, D., & Widy-Tyszkiewicz, E. (2019). Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose-induced memory impairment. *Behavioural Brain Research*, 368(April), 111896. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.04.010>
- Lier, J., Streit, W. J., & Bechmann, I. (2021). Beyond activation: Characterizing microglial functional phenotypes. *Cells*, 10(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells10092236>
- Lin, P., Isabel, B.-L., & Song, W. (2022). The synapse as a treatment avenue for Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*, 27, 2940–2949.
- Liston, C., McEwen, B. S., & Casey, B. J. (2009). Psychosocial stress reversibly disrupts prefrontal processing and attentional control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 912–917. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807041106>
- Long, J., Wang, X., Gao, H., Liu, Z., Liu, C., Miao, M., Cui, X., Packer, L., & Liu, J. (2007). D-Galactose toxicity in mice is associated with mitochondrial dysfunction: Protecting effects of mitochondrial nutrient R-alpha-lipoic acid. *Biogerontology*, 8(3), 373–381. <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9081-y>
- Luijckx, L., Rodriguez, M., & Machaalani, R. (2024). Quantifying GFAP immunohistochemistry in the brain – Introduction of the Reactivity score (R-score) and how it compares to other methodologies. *Journal of Neuroscience Methods*, 402(November 2023), 110025. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.110025>
- Lushchak, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI Journal*, 20, 956–967. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3596>
- Ma, Y., Ma, B., Shang, Y., Yin, Q., Wang, D., Xu, S., Hong, Y., Hou, X., & Liu, X. (2018). Flavonoid-rich ethanol extract from the leaves of *Diospyros kaki* attenuates D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation-mediated brain aging in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8938207>

- Martí-Clúa, J. (2024). 5-Bromo-2'-deoxyuridine labeling: Historical perspectives, factors influencing the detection, toxicity, and its implications in the neurogenesis. *Neural Regeneration Research*, 19(2), 302–308. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.379038>
- Matute-Blanch, C., Montalban, X., & Comabella, M. (2017). Multiple sclerosis, and other demyelinating and autoimmune inflammatory diseases of the central nervous system. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 146, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804279-3.00005-8>
- Meng, L., Zou, L., Xiong, M., Chen, J., Zhang, X., Yu, T., Li, Y., Liu, C., Chen, G., Wang, Z., Ye, K., & Zhang, Z. (2022). A synapsin I cleavage fragment contributes to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 21(5), 1–16. <https://doi.org/10.1111/acer.13619>
- Moreira, P. I., Nunomura, A., Nakamura, M., Takeda, A., Shenk, J. C., Aliev, G., Smith, M. A., & Perry, G. (2008). Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(8), 1493–1505. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.002>
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201–211. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
- Nichols, E., Steinmetz, J. D., Vollset, S. E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T. T., Al Hamad, H., Alahdab, F., Alanezi, F. M., Alipour, V., Almustanyir, S., Amu, H., Ansari, I., Arabloo, J., Ashraf, T., ... Vos, T. (2022a). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 7(2), e105–e125. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8)
- Nichols, E., Steinmetz, J. D., Vollset, S. E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T. T., Al Hamad, H., Alahdab, F., Alanezi, F. M., Alipour, V., Almustanyir, S., Amu, H., Ansari, I., Arabloo, J., Ashraf, T., ... Vos, T. (2022b). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 7(2), e105–e125. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8)
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>
- Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016). Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 144, 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Vol. 3, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(83\)90049-5](https://doi.org/10.1016/0143-4179(83)90049-5)

- Piek, J. M., & Tamussino, K. (2023). Neuroinflammation: The Devil Is in the Details. *Journal of the American College of Surgeons*, 237(5), 796–797.
<https://doi.org/10.1097/XCS.0000000000000815>
- Podcasy, J. L., & Epperson, C. N. (2022). Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 437–446.
<https://doi.org/10.31887/dcns.2016.18.4/cepperson>
- Prasad, K. (2019). AGE–RAGE stress: a changing landscape in pathology and treatment of Alzheimer’s disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 459(1–2), 95–112.
<https://doi.org/10.1007/s11010-019-03553-4>
- Prut, L., Belzung, C., Rabelias, U. F., & Psychobiologie, E. (2003). *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors : a review*. 463, 3–33.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Rangubpit, W., Sungted, S., Wong-Ekkabut, J., Distaffen, H. E., Nilsson, B. L., & Dias, C. L. (2024). Pore Formation by Amyloid-like Peptides: Effects of the Nonpolar-Polar Sequence Pattern. *ACS Chemical Neuroscience*, 15(18), 3354–3362.
<https://doi.org/10.1021/acscemneuro.4c00333>
- Rebollo, E., Zimmermann, T., Moreno Manrique, J. F., Voit, P. R., Windsor, K. E., Karla, A. R., Rodriguez, S. R., & Beaudoin, G. M. J. (2019). SynapseJ: An Automated, Synapse Identification Macro for ImageJ. *Frontiers in Neural Circuits*, 15(October), 235–274.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9686-5_12
- Rehman, S. U., Shah, S. A., Ali, T., Chung, J. Il, & Kim, M. O. (2017). Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. *Molecular Neurobiology*, 54(1), 255–271.
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9604-5>
- R.G., L. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 180–185.
- Sáiz-Vázquez, O., Gracia-García, P., Ubillos-Landa, S., Puente-Martínez, A., Casado-Yusta, S., Olaya, B., & Santabárbara, J. (2021). Depression as a risk factor for alzheimer’s disease: A systematic review of longitudinal meta-analyses. *Journal of Clinical Medicine*, 10(9).
<https://doi.org/10.3390/jcm10091809>
- Salta, E., Lazarov, O., Fitzsimons, C. P., Tanzi, R., Lucassen, P. J., & Choi, S. H. (2023). Adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer’s disease: A roadmap to clinical relevance. *Cell Stem Cell*, 30(2), 120–136. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.01.002>
- Santos, N. (2011). Synaptic Pruning. In *Encyclopedia of Child Behavior and Development* (pp. 1464–1465). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-79061-9_2856

- Sara, Y., Arıkan, K. B., Unal, B., Unal, C. T., & Özcan, T. (2022). The link between learning performance, immobility in the forced swim test, and hippocampal glia. *Experimental Biomedical Research*, 5(1), 23–37. <https://doi.org/10.30714/j-ebr.2022173848>
- Scheggi, S., De Montis, M. G., & Gambarana, C. (2018). Making sense of rodent models of anhedonia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21(11), 1049–1065. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy083>
- Shwe, T., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2018a). Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. In *Experimental Gerontology* (Vol. 101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.029>
- Shwe, T., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2018b). Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. In *Experimental Gerontology* (Vol. 101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.029>
- Song, T., Song, X., Zhu, C., Patrick, R., Skurla, M., Santangelo, I., Green, M., Harper, D., Ren, B., Forester, B. P., Öngür, D., & Du, F. (2021). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer’s disease: A meta-analysis of in vivo magnetic resonance spectroscopy studies. *Ageing Research Reviews*, 72, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101503>
- Su, H., Peng, C., & Liu, Y. (2024). Regulation of ferroptosis by PI3K/Akt signaling pathway: a promising therapeutic axis in cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12(March), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1372330>
- Targa Dias Anastacio, H., Matosin, N., & Ooi, L. (2022). Neuronal hyperexcitability in Alzheimer’s disease: what are the drivers behind this aberrant phenotype? *Translational Psychiatry*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02024-7>
- Ullah, F., Ali, T., Ullah, N., & Kim, M. O. (2015a). Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. *Neurochemistry International*, 90, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.001>
- Ullah, F., Ali, T., Ullah, N., & Kim, M. O. (2015b). Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. *Neurochemistry International*, 90, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.001>
- Vaquero-Puyuelo, D., De-La-cámara, C., Olaya, B., Gracia-García, P., Lobo, A., López-Antón, R., & Santabárbara, J. (2021). Anhedonia as a potential risk factor of alzheimer’s disease in a community-dwelling elderly sample: Results from the zarademp project. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041370>

- Vaz, M., & Silvestre, S. (2020a). Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*, 887(May), 173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>
- Vaz, M., & Silvestre, S. (2020b). Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*, 887(May), 173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>
- Verkhatsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C., & Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(October), 399–412.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, C., Wu, H. M., Jing, X. R., Meng, Q., Liu, B., Zhang, H., & Gao, G. D. (2012). Oxidative parameters in the rat brain of chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonia-like responses. *Journal of Membrane Biology*, 245(11), 675–681. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9436-4>
- Wang, X., Fu, X., Luo, X., Lai, Y., Cai, C., Liao, Y., Dai, Z., Fang, S., & Fang, J. (2024). Network Proximity Analysis Deciphers the Pharmacological Mechanism of Osthole against D-Galactose Induced Cognitive Disorder in Rats. *Molecules*, 29(1). <https://doi.org/10.3390/molecules29010021>
- Wen, L., Danlei, B., & Shen, Y. (2024). Complement-mediated synapse loss in Alzheimer's disease: mechanisms and involvement of risk factors. *Trends in Neurosciences*, 47(2), 135–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.11.010>
- Wendimu, M. Y., & Hooks, S. B. (2022). Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*, 11(13). <https://doi.org/10.3390/cells11132091>
- Wilson, D. M. et al. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. *CellPress*, 186(4), 693–714.
- Yang, B., Parsha, K., Schaar, K., Xi, X., Aronowski, J., & Savitz, S. (2018). Interplay between innate immunity and Alzheimer's disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0051-1>.Interplay
- Zana, M., Janka, Z., & Kálmán, J. (2007). Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 28(5), 648–676. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.03.008>
- Zappa Villar, M. F., López Hanotte, J., Falomir Lockhart, E., Trípodí, L. S., Morel, G. R., & Reggiani, P. C. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *Journal of Neural Transmission*, 125(12), 1787–1803. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>

- Zhang, B., Lian, W., Zhao, J., Wang, Z., Liu, A., & Du, G. (2021). DL0410 Alleviates Memory Impairment in D-Galactose-Induced Aging Rats by Suppressing Neuroinflammation via the TLR4/MyD88/NF- κ B Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6521146>
- Zhang, X., Ge, T. T., Yin, G., Cui, R., Zhao, G., & Yang, W. (2018). Stress-induced functional alterations in amygdala: Implications for neuropsychiatric diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 12(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00367>
- Zhang, X. Y., Diaz-DelCastillo, M., Kong, L., Daniels, N., MacIntosh-Smith, W., Abdallah, A., Domanski, D., Sofrenovic, D., Yeung, T. P., Valiente, D., Vollert, J., Sena, E., Rice, A. S., & Soliman, N. (2023). A systematic review and meta-analysis of thigmotactic behaviour in the open field test in rodent models associated with persistent pain. In *PLoS ONE* (Vol. 18, Issue 9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290382>
- Zheng, Q., & Wang, X. (2024). *Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy*.

ANEXOS

1A. Neuronas teñidas con la tinción de Golgi

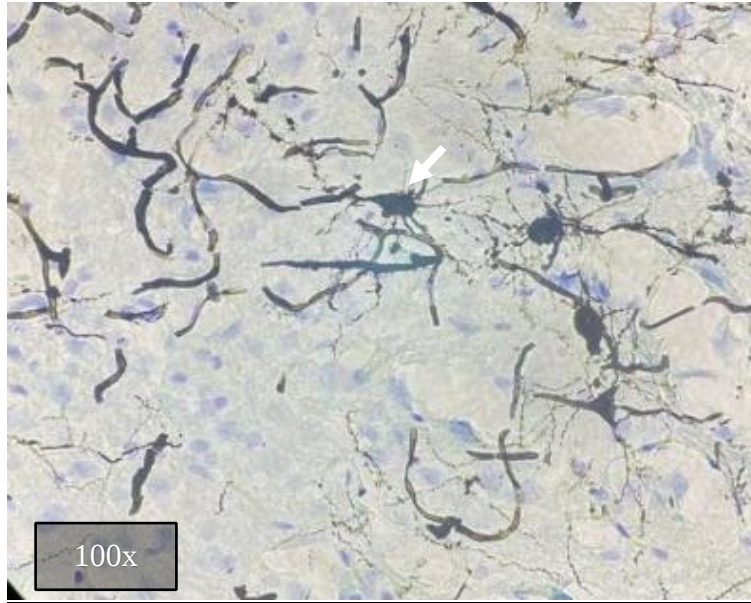


Fig. No 22. **Resultados de los ensayos de Golgi.** En la imagen se observa una neurona (flecha) con sus estructuras más características (soma y axón) del hipocampo de ratas hembra. No se logró estandarizar este protocolo debido a desperfectos mecánicos en el criostato. El protocolo que se siguió está descrito en la metodología.