



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Caracterización neuroanatómica de *Callithrix jacchus* y *Tupaia belangeri* como
modelos de envejecimiento natural”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. DANIEL CUERVO ZANATTA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directora de la Tesis:

DRA. CLAUDIA PÉREZ CRUZ

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2015

Agradecimientos

A Dios.- Por haberme dado la fortuna de haber conocido a grandes docentes y amigos en el CINVESTAV y la fortaleza para realizar un sueño académico.

Al CONACyT.- Por aportar los recursos financieros para lograr la obtención de mi grado.

A mis papás.- Por procurar mi salud y mi educación todos estos años, por el cariño y la seguridad con que me han apoyado siempre y por hacer más fácil mi camino día con día, consideren suyo cualquiera de mis logros.

A mi hermano y a mis hermanas.- Por apoyarme en mis decisiones y por conformar una parte tan importante de mi vida.

A toda mi familia.- Por haberme hecho saber que sea cual sea el problema jamás voy a enfrentarlo sólo.

A la doctora Claudia Pérez Cruz.- Por apoyarme en todo momento y por haberme proporcionado las herramientas y los recursos para la obtención de mi grado académico. Por todas las oportunidades que me brindó para realizarme como profesional y como persona, muchas gracias.

A los doctores José Carmen Luna Muñoz, Marco Antonio Meraz Ríos y José Antonio Terrón Sierra.- Por sus comentarios y su asesoría para hacer de esta tesis un mejor trabajo.

A la doctora Jacqueline Ivette Acosta García, auxiliar del laboratorio de neuroplasticidad y neurodegeneración.- Por ayudarme en mi trabajo y por enseñarme a trabajar de manera ordenada.

A Silvia Zapata.- Por haberme respaldado siempre, por haberme recibido en su casa, por apoyarme en todo momento y, sobre todo, por nunca haberme dejado morir sólo ante alguna de mis locas iniciativas.

A Luis Leonhardt.- Por su incondicional personalidad servicial tan característica que facilitó siempre el trabajo en el laboratorio y por sus pinceladas humorísticas que amenizaron siempre mi estancia.

A Eduardo García.- Por colaborar siempre con el correcto funcionamiento del laboratorio y conseguir lo que fuera necesario para continuar con el trabajo diario.

A mi eterna brigada A y a todos mis amigos.- Por nunca dudar del hecho de que conseguiría cumplir mis objetivos y ser parte importante en mi determinación para lograrlo.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
1.- Introducción	3
1.1.- Envejecimiento.....	3
1.1.1.- Envejecimiento exitoso	4
1.1.2.- Cambios fisiológicos y conductuales en sujetos viejos.....	5
1.1.3.- Alteraciones cerebrales en sujetos viejos	6
1.1.4.- Cambios neuromorfológicos en sujetos viejos.....	8
1.2.- Principales marcadores de senescencia cerebral	11
1.2.1.- Acumulación de A β con la edad	11
1.2.2.- Hiperfosforilación de la proteína tau durante el envejecimiento	12
1.2.3.- Alteración del sistema inmunológico en el envejecimiento: neuroinflamación	14
1.2.4.- Cambios en SOM durante la senescencia	16
1.3.- Modelos animales de envejecimiento natural	17
1.3.1.- Modelos murinos.....	18
1.3.2.- Primates no humanos	18
1.3.2.1.- Marmoseta común	19
1.3.2.2.- Musaraña arborícola.....	20
2.- Planteamiento del problema.....	22
3.- Justificación.....	23
4.- Hipótesis.....	24
5.- Objetivos	25
5.1.- General	25
5.2.- Específicos	25
6.- Metodología	26
6.1.- Obtención y características del tejido animal.....	26
6.2.- Inmunohistoquímica.....	27
6.2.1.- Anticuerpos	27
6.2.2.- Inmunofluorescencia	28

6.3.- Obtención de imágenes	29
6.4.- Análisis de datos	30
6.5.- Análisis estadístico.....	30
7.- Resultados	31
7.1.- Marmoseta común	31
7.1.1.- SOM	31
7.1.2.- GFAP.....	36
7.2.- Musaraña arborícola.....	41
7.2.1.- SOM	41
7.2.2.- GFAP.....	46
8.- Discusión.....	51
8.1.- SOM.....	51
8.2.- GFAP.....	52
9.- Conclusión.....	55
10.- Perspectivas.....	56
11.- Referencias	57

Índice de figuras

Figura 1.- Marmoseta común o <i>Callithrix jacchus</i>	19
Figura 2.- Musaraña arborícola o <i>Tupaia belangeri</i>	21
Figura 3.- Neuronas SOM+ en cerebros de marmoseta común.....	33
Figura 4.- Conteo de células SOM+	34
Figura 5.- Tamaño relativo del soma de las neuronas SOM+	35
Figura 6.- Astroctitos GFAP+ en cerebros de marmoseta común	38
Figura 7.- Conteo de células GFAP+	39
Figura 8.- Tamaño relativo del cuerpo celular de astrocitos GFAP+.....	40
Figura 9.- Neuronas SOM+ en cerebros de musaraña arborícola.....	43
Figura 10.- Conteo de células SOM+	44
Figura 11.- Tamaño relativo del soma de las neuronas SOM+	45
Figura 12.- Astroctitos GFAP+ en cerebros de musaraña arborícola.....	48
Figura 13.- Conteo de células GFAP+.	49
Figura 14.- Tamaño relativo del cuerpo celular de astrocitos GFAP+.....	50

Índice de tablas

Tabla 1.- Descripción de los sujetos experimentales.....	26
Tabla 2.- Anticuerpos primarios utilizados para este estudio.....	27
Tabla 3.- Anticuerpos secundarios utilizados en este estudio	27

Abreviaturas

↑GFAP.- Incremento en el número de células inmuno-reactivas a proteína acídica glial fibrilar

↓SOM.- Decremento en el número de células inmuno-reactivas a somatostatina

A+B.- Complejo avidina-biotina

A β .- Beta amiloide

AD.- Alzheimer's Disease

AMPc.- Adenosín monofosfato cíclico

ANOVA-1-Vía.- Análisis de varianza de una vía

APP.- Proteína precursora amiloidea

BSA.- Albúmina de suero bovino

Ca⁺.- Calcio

CY3.- Cianina-3

DAPI.- 4,6-diamidino-2-fenilindol

DNA.- Ácido desoxirribonucleico

DPZ.- Centro alemán de primates

EA.- Enfermedad de Alzheimer

e. g.- Por ejemplo

GABA.- Ácido gamma-aminobutírico

GFAP+.- Marca positiva contra proteína acídica glial fibrilar

GFAP.- Proteína acídica glial fibrilar

GPCR's.- Receptores acoplados a proteínas G

GSK-3 β .- Glucógeno sintasa kinasa 3 β

Ig.- Inmunoglobulina

K⁺.- Potasio

KCl.- Cloruro de potasio

KH₂PO₄.- Fosfato monobásico de potasio

M.- Molar

MAP.- Proteína de asociación a microtúbulos

MAPs.- Proteínas de asociación a microtúbulos

μm .- Micrómetro
MNFs.- Marañas neurofibrilares
 Na^+ .- Sodio
 Na_2HPO_4 .- Fosfato dibásico de sodio
 NaCl .- Cloruro de sodio
nm.- nanómetros
No.- Número
PBS.- Buffer salino de fosfatos
PDE4.- Fosfodiesterasa 4
PFA.- Paraformaldehído
PHFs.- Filamentos helicoidales apareados
PKA.- Proteína quinasa A
PP2A.- Proteín-fosfatasa 2A
PP2B.- Proteín- fosfatasa 2B
SO.- Stratum oriens
SOM+.- Marca positiva contra somatostatina
SOM.- Somatostatina
SOMR.- Receptor a somatostatina
SSC.- Buffer de citratos
SSC-T.- Buffer de citratos + Tween-20
TBS.- Tris-buffer salino
TSA.- Sistema de amplificación para señal de tiramida

Resumen

Hasta la fecha, ningún modelo de senescencia animal ha sido completamente validado debido a la complejidad de los eventos involucrados para esta condición. Sin embargo, los primates no-humanos prometen ser un buen modelo para mimetizar esta condición debido a su similitud genética y fisiológica con el ser humano. La marmoseta común es un primate del nuevo mundo, que en edades avanzadas presenta acumulación de péptido beta-amiloide ($A\beta$) en cerebro, un marcador clásico de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, la musaraña arborícola es un insectívoro filogenéticamente más cercano al humano que los roedores y en él se ha reportado acumulación de péptido $A\beta$ y de placas amiloideas y somatostatinérgicas en cerebro de animales viejos. Esto aunado a un deterioro cognitivo en animales seniles nos permite proponer a estas especies como un buen modelo para el estudio de la senescencia.

El neuropéptido somatostatina (SOM) es un marcador de interneuronas GABAérgicas, las cuales se encuentran disminuidas en cerebro de ratas viejas, ratones transgénicos y pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA). Por otro lado, la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) es un marcador de astrocitos activos, los cuales se encuentran incrementados durante el envejecimiento. En el presente estudio analizamos el número y el área relativa de células inmuno-reactivas a SOM (SOM+) y a GFAP (GFAP+) en cerebros jóvenes, adultos y seniles de marmoseta y de musaraña. Se realizaron cortes cerebrales de 50 μm a partir de tejido fijo (en paraformaldehído (PFA) al 4%) y se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia a 20x para analizarse con el programa ImageJ. Nuestros resultados muestran un decremento en el número de neuronas reactivas a SOM (\downarrow SOM) y un aumento en la cantidad de astrocitos reactivos a GFAP (\uparrow GFAP) en CA1, subiculum y corteza entorrinal para cerebros viejos de marmoseta y de musaraña al comparárseles con cerebros más jóvenes. Para el área relativa de las células SOM+ y GFAP+ se observó un incremento significativo dependiente de la edad en CA1, subiculum y corteza entorrinal para los cerebros de ambas especies. Estos resultados describen por

primera vez diferencias regionales y ontogénicas en la inmuno-reactividad a SOM y a GFAP en primates no humanos y especies relacionadas.

Abstract

At present, no animal models of ageing have been fully validated, mainly because of the complexity of events involved in this process. Furthermore, non-human primates most likely represent good models to mimic age-related changes in humans based on the high genetic and physiological similarities with them. Common marmosets are small body sized New-World primates, that during ageing present aggregated beta-amyloid (A β) peptide in brain, a classic biomarker for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). On the other hand, tree shrews are insectivores closely related to primates compared with rodents. Aged tree shrews develop loss of serotonergic fibers, A β peptide accumulation and SOM-like plaque structures in several regions of the brain. These changes, accompanied with reported cognitive decline in aged subjects, lead us to propose these animals as models of ageing.

The neuropeptide somatostatin (SOM) is a marker for a specific subtype of gamma-aminobutyric-acid (GABA) interneurons that are decreased in aged rats, transgenic mice and AD patients. On the other hand, glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a marker for active astrocytes that are increased in normal ageing.

In the present study we analyzed the number and size of immunoreactive SOM- (SOM+) and GFAP- (GFAP+) positive cells in brains from adult and newborn common marmosets and tree shrews. Transversal (tree shrew) and coronal (common marmoset) 50- μ m brain sections were obtained from fixed tissue (4 % paraformaldehyde (PFA)). Confocal microscopy was used to obtain 20x images that were analyzed using the ImageJ program. Our results showed a decrease in the number of SOM-positive neurons and an increase in the amount of GFAP-positive astrocytes in CA1, subiculum and entorhinal cortex for common marmoset and tree shrews aged brains as compared to young brains. Regarding cell body size SOM+ and GFAP+ cells, we observed an age-related significant increase in CA1, subiculum and entorhinal cortex in the brains of both species. To our knowledge, this is the first

time regional differences in SOM and GFAP immunoreactivity across ontogeny in a non-human primate and in a closely related species are described.

1.- Introducción

1.1.- Envejecimiento

El envejecimiento se define como una disminución funcional dependiente de la edad que afecta a la mayoría de seres vivos. Se caracteriza por una pérdida progresiva en la integridad del organismo, lo cual lo lleva a un deterioro fisiológico relacionado con una mayor vulnerabilidad a condiciones como el cáncer, la diabetes, los desórdenes cardiovasculares, las demencias y, eventualmente, la muerte [1].

Desde el punto de vista evolutivo son varias las teorías que sentaron las bases para explicar el proceso de senectud [2]. Destacan la propuesta por Medawar (acumulación de mutaciones) en 1952, la cual postulaba que aquellos organismos que llegaran a presentar mutaciones perjudiciales en etapas seniles habían heredado este “daño acumulado” a generaciones posteriores durante su etapa reproductiva [3]; la de Williams en 1957 (pleiotropía antagónica) que mencionaba que un solo gen podía estar involucrado en características fenotípicamente no relacionadas entre sí y que su efecto, benéfico o perjudicial, dependería de la edad del organismo [4] y la de Kirkwood en 1977, que propuso una mejor compensación entre funciones biológicas de crecimiento, mantenimiento y reproducción, producto de una adaptación evolutiva [5].

Esta última postura podría sentar las bases del llamado “envejecimiento exitoso”, donde sujetos con edades avanzadas son capaces de compensar el daño gracias al uso de áreas alternas que relevan funciones fisiológicas y cognitivas (1.1.1.- Envejecimiento exitoso).

Cabe resaltar que todas estas teorías toman en cuenta que varios procesos involucrados con el envejecimiento (como la edad reproductiva y la esperanza de

vida) dependen de factores tanto heredables como ambientales, y es precisamente por eso que pueden ser modificados por un proceso de selección natural [2].

1.1.1.- Envejecimiento exitoso

Factores que han venido cobrando importancia durante los últimos años como el incremento sustancial en la esperanza de vida, los múltiples avances en la ciencia médica y mayores expectativas de vida, han desatado un interés en el ámbito de la investigación científica de cómo favorecer un estado senescente más saludable y en cómo envejecer “exitosamente” [6].

El estilo de vida y diversos factores acumulables durante el transcurso de la vida de un individuo pueden llegar a exponer a una persona a un riesgo mayor de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas durante su vejez. Por el contrario, el envejecimiento exitoso es descrito como una habilidad para mantenerse en bajo riesgo de enfermar, con un alto nivel de actividad física y mental y, decididamente comprometido con la vida manteniendo relaciones personales y participando en actividades significativas para la comunidad [7]. Biomédicamente, se define como una optimización en la esperanza de vida minimizando discapacidad y deterioro físico y mental [6].

Además, la capacidad de compensar funciones perdidas mediante el relevo de otras áreas, ofrece al individuo una mayor competencia para desarrollar su vida diaria de manera independiente.

Se propone que las pérdidas funcionales son con frecuencia sobrestimadas; que muchas de las pérdidas funcionales verificadas con el paso del tiempo pueden ser evitadas; y que muchas pérdidas funcionales en los adultos mayores pueden ser recuperadas [7]. Esto ofrece un panorama prometedor para los adultos mayores, ya que el envejecimiento puede enfocarse a un proceso de “actividad” donde el

comprometerse en acciones sociales, deportivas y mentales podrían evitar el desarrollo de enfermedades hoy en día asociadas con la edad.

1.1.2.- Cambios fisiológicos y conductuales en sujetos viejos

En el periodo comprendido entre la tercera y la cuarta década de vida pueden comenzar a manifestarse cambios funcionales irreversibles de manera sutil, acompañados de un deterioro progresivo dependiente de la edad. La velocidad con la cual puede observarse este declive funcional varía en función del órgano en consideración, pero es relativamente constante para un sistema determinado; así, la velocidad de envejecimiento es la misma para un hombre de 45 años que para uno de 85, la diferencia es que a los 85 años habrá una mayor acumulación de cambios dependientes de la edad [8].

A nivel vascular, los cambios más importantes son aquéllos que se presentan en las propiedades mecánicas y estructurales de la pared vascular. Las arterias presentan propiedades intrínsecas y funcionales que están sujetas a estrés y a cambios hormonales a lo largo de la vida y que pueden experimentar modificaciones en presencia de diversos factores de riesgo, los cuales pueden ser modificables (e. g. hipertensión, obesidad y estilo de vida) o no modificables (e. g. genética, historia familiar y edad) [9].

Otros órganos como los riñones y el intestino también están ligados a un declive funcional en el envejecimiento. Muchas personas experimentan una disminución progresiva en su tasa de filtración glomerular [10] y en su flujo sanguíneo renal [11]. Para el sistema gastrointestinal se ha reportado ya una disminución en el tránsito fecal a nivel del colon en pacientes ancianos con respecto a sujetos más jóvenes [12] y una disfunción en la barrera intestinal de ratas viejas [13]. La función pulmonar permanece relativamente estable entre los 20 y los 35 años de edad, sin embargo, los cambios a la baja se hacen mucho más drásticos en etapas posteriores [14].

Por otra parte, las enfermedades musculoesqueléticas son la causa más común de discapacidad crónica en personas mayores de 65 años [15]. Además, la edad afecta la biomecánica del caminado y constituye un importante factor de riesgo demográfico para el desarrollo de limitaciones motoras [16].

En el sistema nervioso se pueden observar muchos cambios no patológicos en la función neurológica, los cuales se asocian principalmente a senescencia tisular e incapacidad regenerativa. El comportamiento del paciente puede revelar información importante con respecto a ésta; por ejemplo, es posible caracterizar una disfunción orbitofrontal por conductas como impulsividad, falta de juicio y conducta antisocial, mientras que otras conductas como falta de atención y apatía se relacionan más con disfuncionalidad en el lóbulo frontal dorsolateral y en la corteza frontomedial respectivamente [17].

Existen condiciones relacionadas estrechamente con demencia y desórdenes cognitivos en edades avanzadas [18]. La fragilidad por ejemplo, es un estado geriátrico multidimensional que refleja cambios fisiológicos en diversos sistemas y una vulnerabilidad inespecífica con un riesgo incrementado de adversidad para el estado de salud (e. g. incapacidad, caídas, hospitalización y mortalidad por diferentes causas) [19]. Se ha sugerido que los desórdenes afectivos y cognitivos, así como el estado físico y nutricional del paciente pudieran representar marcadores de fragilidad [20].

Entre otras características que también se han ligado a un envejecimiento neurológico destacan perturbaciones en el ánimo del paciente como depresión y apatía [17].

1.1.3.- Alteraciones cerebrales en sujetos viejos

La teoría de los radicales libres propone que una disfunción mitocondrial progresiva característica del envejecimiento incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual a su vez favorece un mayor deterioro mitocondrial y daño celular

[21] del cual el sistema nervioso central resulta ser altamente vulnerable [22]. La calidad de la respuesta a estos acontecimientos se ha asociado a una mejor esperanza de vida y a una disminución en el proceso neurodegenerativo [22].

El estrés oxidativo es responsable de daños significativos a nivel de los lípidos de la membrana celular, debido a que puede producir aldehídos altamente reactivos. El malondialdehído por ejemplo (resultado de la peroxidación del ácido araquidónico), induce daño al ácido desoxirribonucleico (DNA) por reaccionar con proteínas y producir aductos capaces de perjudicar el apareamiento de bases nitrogenadas [23]. Se ha observado un incremento en los niveles de esta especie química en el citoplasma de neuronas y de astrocitos propios de cerebros humanos viejos [24].

Se ha sugerido que uno de los eventos más tempranos en el daño oxidativo a nivel cerebral es el incremento de la activación microglial, la cual constituye una fuente abundante de radicales libres en el cerebro (e. g. superóxido y óxido nítrico) [25]. Estos radicales pueden producir daño celular, y sus productos de reacción (e. g. peróxido de hidrógeno y nitritos) están involucrados en el daño oxidativo y la muerte neuronal en enfermedades neurológicas [26].

En estudios realizados en monos Rhesus ancianos pudo observarse una correlación entre una disfunción mitocondrial y cambios metabólicos a la baja como dislipidemia y resistencia a la insulina en regiones hipocampales [27]. Esta resistencia incrementa con el envejecimiento [28] y en enfermedades relacionadas con la edad como la EA [29].

La señalización de la insulina normalmente facilita el flujo sanguíneo microvascular y la captura de glucosa [30]. Estos efectos ocurren predominantemente en regiones cerebrales específicas que tienen altas concentraciones de receptores a insulina en roedores, las cuales también se ven afectadas en etapas tempranas de la EA (e. g. hipocampo, corteza prefrontal y giro cingulado) [28], [31], [32].

Existen además otras alteraciones cerebrales dependientes de la edad, entre las cuales destacan alteraciones en mecanismos de comunicación intercelular [1], incrementos en las concentraciones de hierro y de su potencial redox-activo (lo cual puede desatar mecanismos de estrés oxidativo y de daño mitocondrial) [33] y cambios neuromorfológicos asociados al volumen encefálico.

1.1.4.- Cambios neuromorfológicos en sujetos viejos

Los cambios neuromorfométricos asociados al proceso de envejecimiento pueden dividirse en 2 categorías de acuerdo a las regiones cerebrales involucradas [34]. La primera se refiere al daño que se presenta en la corteza pre-frontal, el cual se encuentra estrechamente relacionado con un deterioro severo en procesos como velocidad en el procesamiento y memoria de trabajo [35]. La segunda involucra deterioro en el hipocampo (en donde se ha reportado una reducción de volumen por envejecimiento) y en el lóbulo temporal medial (zona relacionada con procesos de memoria episódica que se ve disminuida con la edad; además, se ha sugerido que una atrofia estructural a este nivel resulta predictiva para un futuro deterioro cognitivo no patológico) [34], [36], [37], [38].

Dentro de los cambios mejor caracterizados en ancianos destaca una atrofia cerebral generalizada estrechamente relacionada con una merma en el volumen de la sustancia gris y de la sustancia blanca, así como un incremento en el volumen de los espacios ventriculares [34]. Se ha documentado también que el volumen y/o el peso del cerebro se ve disminuido alrededor de un 5% cada década a partir de los 40 años de edad [39]; esta tasa puede presentar un incremento significativo, particularmente en individuos mayores a los 70 años [40].

Desde la década de los 50's se sugería que una reducción dependiente de la edad en el volumen cerebral podía deberse a un decremento en el número de neuronas presentes en la corteza [41]. Además, en primates no humanos (mono Rhesus) de edad

avanzada se han reportado cambios muy significativos a la baja en el número y en el tamaño de neuronas colinérgicas [42], y en la cantidad de células neocorticales [43].

Cabe resaltar que esta aseveración se encuentra en controversia, debido a que se ha documentado que los cerebros adultos son capaces de compensar ciertos daños generando nuevas conexiones en las neuronas remanentes [44]. En general, no se ha podido demostrar neurogénesis en cerebros de primates no humanos adultos (mono rhesus), lo cual sugiere que todas sus neuronas son generadas durante etapas prenatales y etapas tempranas post-natales [45]. Sin embargo, en la clínica si se ha reportado neurogénesis en humanos adultos [46].

La edad se ha relacionado también con modificaciones neuronales ajenas a la muerte celular como retracción dendrítica y cambios en la densidad de espinas [47]. Existen reportes que documentan una relación proporcional entre la edad y un retraimiento progresivo no patológico en la arborización dendrítica de neuronas piramidales ubicadas en la corteza motora de humanos [48] y en la corteza prefrontal y temporal de primates no humanos [49]. Así mismo, para la densidad de espinas ya se ha reportado una disminución significativa en el subiculum de *Macaca mulatta* viejas [50].

También, diversas células cerebrales experimentan cambios estructurales relacionados con el envejecimiento. Estos cambios incluyen muerte de células nerviosas [51], retracción dendrítica, pérdida sináptica y reactividad glial [52]; pudiendo ser el resultado de alteraciones en proteínas asociadas al citoesqueleto (e. g. microtúbulos) y deposición de proteínas insolubles como tau y α -sinucleína dentro de las células, así como de $A\beta$ en el espacio extracelular [52]. Así mismo, alteraciones en las vías de señalización que regulan el crecimiento y la motilidad celular pueden contribuir a cambios estructurales tanto adaptativos como patológicos en un cerebro que envejece [52].

Conforme el organismo va envejeciendo sus neuronas experimentan modificaciones estructurales selectivas sin un patrón universal bien definido, los cuales se deben principalmente a pequeños cambios específicos en zonas de ramificación dendrítica y de densidad sináptica [53]. Además, las células cerebrales presentan una susceptibilidad particular a los efectos acumulados que acarrea el envejecimiento (e. g. acumulación de proteínas dañadas y anomalías en ácidos nucleicos), lo cual favorece que la interacción entre factores genéticos y ambientales con los cambios celulares y moleculares dependientes de la edad, sean los principales determinantes para discernir qué células envejecerán de manera exitosa y cuáles serán víctimas de un proceso neurodegenerativo [54].

Esto quiere decir que, dependiendo de qué tanto se haya favorecido un proceso de envejecimiento exitoso en un organismo, los cambios dependientes de la edad que éste acumule a lo largo de su vida impactarán de manera diferente. Por ejemplo, animales que habitan ambientes propicios para su desarrollo muestran un incremento en la expresión de genes para proteínas como el factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico derivado de la glía y el factor neurotrófico derivado del cerebro [55], [56]. Por otra parte, cuando un organismo se encuentra bajo una situación de estrés se favorece la liberación de glucocorticoides [57], los cuales se han relacionado con neurotoxicidad y con daños en el balance energético neuronal [58].

Es importante resaltar que se ha observado un incremento en la conductancia de calcio en algunas poblaciones neuronales de sujetos viejos (lo cual puede resultar tóxico para la célula). Por ejemplo, las células piramidales de CA1 en hipocampos viejos presentan una mayor densidad de canales de calcio tipo L [59] que puede llevar a una disfunción en la homeóstasis iónica [60], contribuyendo así a los déficits de plasticidad descritos con anterioridad [61].

Entre otros aspectos neuromorfológicos importantes, en ratones transgénicos de 11 meses de edad con una isoforma mutante de tau humana (V337M) se ha observado que existe una morfología neuronal irregular asociada con una degeneración celular

atrófica y no apoptótica, acompañada de una acumulación de tau fosforilada [62]. La fosforilación y las modificaciones estructurales en esta proteína pueden llegar a dañar funciones celulares y causar muerte neuronal [63].

1.2.- Principales marcadores de senescencia cerebral

1.2.1.- Acumulación de A β con la edad

La proteína precursora amiloidea (APP) es una proteína transmembranal de gran tamaño que tras su procesamiento es capaz de generar péptidos como A β 1-40 y A β 1-42 [64] que son altamente neurotóxicos [65]. Durante el envejecimiento normal, y para un grado mucho mayor en la EA, se presenta deposición de agregados insolubles de A β (placas amiloideas) en vasos sanguíneos y parénquima del cerebro [52].

A β 40-42 al ser neurotóxico, incrementa la vulnerabilidad neuronal al daño metabólico excitotóxico y oxidativo. La secuencia de eventos implicados en el daño y la muerte celular por A β puede involucrar la inducción de peroxidación lipídica en la membrana de la neurona, lo cual genera un aldehído tóxico (4-hidroxinonenal) capaz de modificar covalentemente proteínas de membrana que participan en la homeostasis iónica y el metabolismo energético como lo son ATPasas de Na⁺/K⁺ y Ca⁺, así como transportadores de glucosa y de glutamato; lo cual puede desencadenar una elevación excesiva de calcio intracelular, disfunción mitocondrial y apoptosis [52].

Además, el péptido A β 40-42 ocasiona pérdida de espinas dendríticas [66], alteraciones a nivel mitocondrial [67], y deterioro cognitivo [68]. Además de inducir procesos de neurodegeneración, A β también puede interferir en la señalización mediada por neurotransmisores, por ejemplo, dificultar el acople entre receptores muscarínicos a acetilcolina y su proteína efectora, lo cual contribuye a déficits bien establecidos en la cascada de señalización colinérgica en la EA [52].

Por otra parte, la acumulación de placas amiloideas se da principalmente en regiones cerebrales relacionadas con la memoria y el aprendizaje (hipocampo y corteza entorrinal). En la EA esta acumulación se ha correlacionado cuantitativamente con degeneración neuronal y con deterioro cognitivo [52].

Finalmente, A β puede también contribuir a la presencia de daño vascular y de procesos inflamatorios en cerebros viejos [52].

1.2.2.- Hiperfosforilación de la proteína tau durante el envejecimiento

El citoesqueleto celular consta principalmente de 3 polímeros proteicos que difieren en su tamaño y composición molecular: los microfilamentos de actina (6 nm de diámetro), los microtúbulos (25 nm de diámetro), conformados por tubulina y los filamentos intermedios (de 10 a 15 nm de diámetro), conformados por proteínas propias de estas estructuras que difieren según la estirpe celular (e.g. neurofilamentos en neuronas y GFAP en astrocitos [52]).

Para regular el ensamblaje y la despolimerización del citoesqueleto, así como para favorecer su interacción con membranas y otras estructuras celulares, las neuronas y las células gliales emplean un conjunto de proteínas asociadas al citoesqueleto. Por ejemplo, las neuronas expresan muchas proteínas de asociación a microtúbulos (MAPs) que se distribuyen diferencialmente en la célula; MAP-2 está presente en dendritas pero no en axones, mientras que tau está presente en axones pero no en dendritas [52].

Los cambios significativos dependientes de la edad en el citoesqueleto no se dan en la cantidad de proteínas que lo conforman, sino en su organización y en sus modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, en algunas regiones cerebrales, particularmente en aquéllas involucradas en procesos de aprendizaje y memoria (e.g. hipocampo), existe un incremento en la cantidad de tau fosforilada [52].

Tau fue descubierta como una proteína de asociación a microtúbulos (MAP) capaz de estimular el ensamblaje de tubulina para la formación de los mismos [69]. Esta actividad pro-ensamblaje está regulada por su grado de fosforilación; es decir, un estado de hiperfosforilación inhibe la habilidad de tau para estimular el ensamblaje de tubulina [70].

Tau hiperfosforilado constituye el principal componente de los filamentos helicoidales apareados (PHFs), los cuales son los principales responsables de la formación de marañas neurofibrilares (MNFs), uno de los marcadores más importantes que se tienen en la actualidad para el diagnóstico molecular de la EA [71], [72], [73] [74].

Se ha reportado también que los residuos de la proteína tau en tejido cerebral sano de humanos adultos y los de la proteína tau responsable de la formación de PHFs en la EA que experimentan fosforilación, coinciden en su gran mayoría. A su vez, se ha sugerido que la presencia de esta proteína no fosforilada en biopsias de pacientes sanos puede deberse a un proceso de desfosforilación *post-mortem* gracias a la actividad de proteín-fosfatasa 2A y 2B (PP2A y PP2B), cuya regulación a la baja en cerebros con EA puede favorecer el perfil molecular de la misma [75].

Este proceso de fosforilación involucra muchas quinasas que pueden incluso trabajar de manera coordinada; por ejemplo, la pefosforilación de tau a causa de la proteína quinasa A (PKA) promueve significativamente su fosforilación a causa de la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK- 3β) *in vitro*, además, se ha reportado una inhibición en la actividad biológica de tau aún más marcada cuando ésta es sometida a un proceso de fosforilación secuencial con 2 o más quinasas [76]. Se ha sugerido también un incremento en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y una pérdida de fosfodiesterasa 4 (PDE4) con la edad, lo cual favorecería la activación de PKA y la eventual fosforilación secuencial de tau mediante el mismo mecanismo [77].

Existen también otros factores ligados a la edad que pueden favorecer este proceso de fosforilación, entre los cuales destacan el estrés oxidativo por disfunción mitocondrial [78], [79] y presencia del péptido A β [80].

1.2.3.- Alteración del sistema inmunológico en el envejecimiento: neuroinflamación

Mientras que la barrera hematoencefálica limita el acceso de linfocitos desde la periferia hacia el cerebro, cada vez es más evidente que este último no carece de respuesta inmune. El cerebro posee células inmunológicas (gliales) residentes que son capaces de responder a procesos neurodegenerativos ligados a la edad o a alguna patología [52].

Existen 3 tipos de células gliales en un sistema nervioso central maduro. Oligodendrocitos, los cuales participan en la formación de la vaina de mielina axonal, responsable en gran medida de la conducción eléctrica saltatoria al dispararse un potencial de acción [81]. Las células microgliales (categorizadas como macrófagos por algunos neurobiólogos), cuya principal función radica en remover remanentes celulares de sitios de lesión o de renovación y metabolismo celular [81]. Finalmente, los astrocitos, los cuales favorecen un ambiente químico apto para la señalización neuronal [81], propician uniones estrechas más herméticas en la barrera hematoencefálica [82] y funcionan como células inmuno-competentes en sistema nervioso central [83].

D

Independientemente de si estas células se encuentran activas o en reposo, son capaces tanto de llevar a cabo funciones benéficas de soporte neuronal, como de volverse nocivas al envejecer, enfermar, morir o al ser incapaces de desempeñar correctamente su papel fisiológico [84]. Los astrocitos por ejemplo, experimentan un proceso de activación que incluye proliferación celular, cambios morfológicos e incremento en su expresión de GFAP [83], lo cual aún se discute si constituye o no un proceso patológico [84].

Diversos reportes de una mayor expresión microglial de interleucina-1 α en humanos [85], un incremento en la expresión de antígenos relacionados al complejo mayor de histocompatibilidad clase 2 en primates no humanos [86] y cambios morfológicos y transiciones fenotípicas de las células microgliales en roedores [87] sugieren que esta activación microglial se hace presente en el envejecimiento normal. A su vez, se ha sugerido una relación entre estos mecanismos con distrofia [87], estrés oxidativo y degeneración por senescencia [84]. Las células gliales aparentan además tener un potencial particular para generar daño oncogénico, justo como queda evidenciado en la naturaleza extremadamente maligna de los glioblastomas [88].

La opinión generalizada de que la astrogliía activa puede acarrear tanto efectos benéficos como perjudiciales abre la posibilidad de que su activación pueda ser dañina bajo ciertas condiciones [84]. Actualmente se piensa que existe una importante asociación entre un proceso de inflamación crónica moderada y la gran mayoría de enfermedades degenerativas dependientes de la edad, incluyendo aquéllas que afectan al sistema nervioso central [89]; lo cual, junto a la literatura que describe fluctuaciones y aumento de citoquinas pro-inflamatorias en la senescencia [90], [91] postula a la neuroinflamación como un buen marcador de envejecimiento.

Estos procesos inflamatorios están asociados e incluso contribuyen a un eventual proceso de neurodegeneración en la EA y en otras condiciones neuropatológicas relacionadas con la edad debido en gran medida a un incremento en la producción de citosinas (interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa [84]) y su asociación con cambios neuropatológicos. A su vez, información emergente propone que las reacciones inflamatorias crónicas pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de algunos desórdenes neurodegenerativos como la EA [52].

1.2.4.- Cambios en SOM durante la senescencia

SOM es una proteína cuya expresión se da en varios órganos. En cerebro de mamíferos, la SOM (también conocida como factor inhibidor de la liberación de somatotropina) se ha encontrado en 2 isoformas, SOM-14 y SOM-28 (de acuerdo al número de aminoácidos que constituyen a cada una de éstas), siendo SOM-14 la predominante [92]. Ésta actúa como un neuropéptido modulador e inhibidor que co-localiza con GABA y está involucrado en múltiples aspectos de regulación fisiológica y respuestas al estrés incluyendo la inhibición en la liberación de varias hormonas hipotalámicas e integración de circuitos locales, lo cual favorece aferencias sensoriales [93].

Estudios inmunohistoquímicos han agrupado a las neuronas somatostatinérgicas en 2 categorías: aquéllas que actúan de forma local en microcircuitos (interneuronas) y aquéllas que proyectan a estructuras distantes (neuronas de proyección distante) [94]. Las células de Martinotti (el tipo más común de interneuronas somatostatinérgicas) presentan axones ascendentes que ramifican hacia la porción dendrítica distal de las neuronas piramidales excitatorias [95], y su presencia se ha documentado en corteza entorrinal [96] e hipocampo [97].

A principios de la década de los 90's, 5 subtipos distintos de receptores a SOM (SOMR1-5) pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR's) fueron caracterizados en varias especies animales, teniendo una homología del 39 al 57% entre cada uno de estos y siendo secuencias altamente conservadas entre diferentes especies [94].

Las funciones inhibitorias de la SOM son atribuidas fundamentalmente a su interacción con estos receptores, reduciendo la liberación de neurotransmisores excitatorios (e.g. glutamato) mediante una señalización inhibitoria (proteína Gi) [94], lo cual podría explicar el efecto inhibitorio de la SOM en la potenciación a largo plazo en el giro dentado de ratón [98], el aumento en la conductancia de potasio en

hipocampo de rata [99], la disminución en la liberación de glutamato en la corteza cerebral de ratón [100] y la disminución en la conductancia de calcio [101].

En ratas viejas se ha reportado una disminución en el número de células somatostatinérgicas en la corteza motora y somatosensorial [102] y en la expresión del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de SOM en la corteza frontal, la corteza parietal y el estriado [103]; además de una reducción en la cantidad de interneuronas en CA1 y en la densidad de subpoblaciones de interneuronas positivas a SOM, calbindina y neuropéptido Y en stratum oriens (SO) [104]. Se han observado también decrementos en la expresión del mRNA de SOM en el hipocampo, la corteza frontal, la corteza temporal, la corteza visual, la corteza motora y la corteza somatosensorial en cerebros de primates viejos [105].

En el proceso de neurodegeneración las alteraciones relacionadas con la SOM destacan aún más, siendo en pacientes con EA donde más se han observado. En estos se ha reportado una disminución en la concentración de SOM en la corteza cerebral [106] y en el líquido cefalorraquídeo, además de una correlación entre este decremento y alteraciones cognitivas [107]. Se ha postulado al péptido A β como un responsable directo de la disminución de SOM, debido a que la administración intracerebroventricular de su fragmento 25-35 en ratas reduce la concentración de SOM de la corteza frontotemporal, la corteza parietal y el hipocampo [108]. Por otra parte, se han reportado alteraciones relacionadas al envejecimiento en circuitos inhibitorios y se ha sugerido que esto puede contribuir al deterioro cognitivo que suele observarse en edades avanzadas [109].

En conjunto, la información anterior sugiere que tanto el número de interneuronas SOM+ como las alteraciones de este neuropéptido representan un valioso marcador de envejecimiento.

1.3.- Modelos animales de envejecimiento natural

1.3.1.- Modelos murinos

Los roedores son ampliamente utilizados como modelos animales debido a su esperanza de vida, su tamaño, su bajo costo y su versátil manejabilidad [110]. Diversos estudios respaldan el uso de ratones como modelos animales de envejecimiento debido a su similitud con el ser humano en muchos aspectos fisiológicos, celulares e incluso anatómicos (e. g. para sistemas como el musculoesquelético, inmune, endócrino y digestivo la similitud entre humano y ratón se da tanto en arquitectura como en función) [111]. Se han manejado además modelos murinos de función cardíaca y de cambios hepáticos [111].

No obstante, existen también diferencias importantes entre ratones y seres humanos para el estudio del envejecimiento. Por ejemplo, el metabolismo de vitaminas, las cuales tienen influencia sobre ciertos procesos relacionados con la edad, es diferente entre ambas especies [112]. Además, en ratones viejos no se observan las típicas enfermedades relacionadas con la edad en seres humanos como lo son los padecimientos cardiovasculares o la EA [111].

La rata se ha usado también como modelo de estudio de los cambios dependientes de la edad en tejido retinal [113] y en episodios de sueño [114]. Sin embargo, al tratarse también de un modelo murino puede pensarse que guarda una relación más estrecha con el ratón que con el ser humano, lo cual sugiere la necesidad de modelos animales más adecuados para el estudio del envejecimiento.

1.3.2.- Primates no humanos

Los primates no humanos son nuestros parientes más cercanos evolutivamente hablando y debido a esto guardan una estrecha similitud con el ser humano en términos de anatomía, embriología, desarrollo fetal, inmunología, bioquímica, fisiología, complejidad conductual y tamaño cerebral, entre otros. Como consecuencia, el uso de estos modelos animales constituye un pilar fundamental para

diversas investigaciones en materia de salud, patología y terapéutica humanas [115], [116].

1.3.2.1.- Marmoseta común

La marmoseta común o *Callithrix jacchus* (Figura 1) es un pequeño primate del nuevo mundo (cuyo peso oscila entre 300 y 500 gramos en adultos en cautiverio) que resulta muy apropiado como modelo de envejecimiento y declive funcional, debido a que presenta la esperanza de vida promedio más corta y la tasa de reproducción más alta de todos los primates antropoides [117].



Figura 1.- Marmoseta común o *Callithrix jacchus*

Estos animales pueden considerarse ancianos aproximadamente desde los 8 años de edad, donde se reporta acumulación amiloidea en la corteza cerebral [118], depósitos de A β [119], disminución en los niveles de calbindina en neuronas colinérgicas [120] y una disminución en el proceso de neurogénesis en el hipocampo [121]. Además, se ha observado un incremento en la probabilidad de muerte por fallas cardíacas y renales en animales ancianos respecto a animales más jóvenes, así como decrementos en tejido graso, medidas morfométricas y albúmina sérica. También se ha reportado una correlación directa entre una postura de estiramiento en reposo, que las marmosetas mayores son más propensas a adoptar, y un riesgo elevado de muerte inminente [115].

Otra similitud importante entre humanos y marmosetas se fundamenta en que estos últimos utilizan la comunicación vocal a corta y a larga distancia para una gran

variedad de comportamientos sociales [122]. Esto los convierte en una especie muy útil para el estudio de la presbiacusia (la cual se presenta de forma frecuente en pacientes seniles), debido a que los investigadores pueden observar el efecto de la edad sobre el proceso auditivo desde un enfoque conductual hasta neurofisiológico [123].

Otra gran ventaja de este modelo radica en su versatilidad para realizar diversas pruebas conductuales como la prueba de Bungalow para determinar conducta explorativa espontánea, la prueba de coordinación mano-ojo para determinar coordinación en conducta motora y la respuesta de sobresalto potenciada por miedo para cuantificar ansiedad [124].

Se ha sugerido también el uso de estos animales para el estudio de otras enfermedades relacionadas con la edad como la enfermedad de Parkinson [125] y de otras condiciones neurodegenerativas como corea de Huntington [126], esclerosis múltiple [127] y modelos de daño en médula espinal [128].

Se ha observado además que este modelo animal presenta reactividad cruzada con citocinas y hormonas humanas. Esto, aunado a su pequeño tamaño, su alta eficiencia reproductiva y sus características cognitivas y conductuales [129] lo hace un modelo animal único y muy prometedor para el estudio del envejecimiento.

1.3.2.2.- Musaraña arborícola

La musaraña arborícola o *Tupaia belangeri* es un animal pequeño cuyo peso corporal oscila entre 200 y 300 gramos [130]. Su estatus taxonómico ha sido objeto de discusión durante décadas; a pesar de haberse considerado un primate hace algún tiempo [131], estudios genómicos más recientes se han encargado de clasificar a la musaraña en un orden distinto entre primates e insectívoros [132], [133].



Figura 2.- Musaraña arborícola o *Tupaia belangeri*

Su esperanza de vida va de los 7 a los 8 años de edad [134], siendo mayor que la de los roedores pero menor que la de caninos y primates del viejo mundo, lo cual sugiere a este animal como un modelo muy prometedor para el estudio del envejecimiento [130]. Además, se ha comprobado ya su efectividad como modelo animal para el estudio de la depresión [134].

Existen reportes de APP e inmuno-reactividad contra $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-16 en vasos sanguíneos cerebrales, y contra $A\beta$ 1-42 en estructuras fibrilares en cerebros de musarañas viejas. Se han encontrado también estructuras celulares con inmuno-reactividad a $A\beta$ 1-42 [130] y estructuras reactivas a SOM que asemejan placas seniles [135] en corteza piriforme, núcleo accumbens y subiculum en cerebros viejos.

Por si fuera poco, el uso de un paradigma de memoria espacial reveló una disminución significativa dependiente de la edad en la memoria de trabajo de animales viejos al compararlos con animales más jóvenes [136].

Cambios dependientes de la edad en estos animales como lo es una reducción de fibras serotoninérgicas en su formación hipocampal [137], además de su similitud genética [132], [133] y molecular [138] con el ser humano, lo convierten en un fuerte candidato como modelo animal para el estudio de los múltiples cambios fisiológicos relacionados al envejecimiento.

2.- Planteamiento del problema

Determinación de alteraciones dependientes de la edad en células con inmunoreactividad a SOM y GFAP en cerebros de marmoseta común y de musaraña arborícola.

3.- Justificación

El incremento sustancial en la esperanza de vida en los últimos años ha resaltado el interés en el ámbito de la investigación médica sobre cómo favorecer un estado senescente más saludable y un envejecimiento “exitoso” [6].

La caracterización de marcadores de envejecimiento en cerebros de marmoseta común y de musaraña arborícola podría apoyar el uso de estas especies como modelos animales para el estudio de cambios acumulados y de condiciones patológicas y no patológicas en la senescencia.

4.- Hipótesis

Los cerebros viejos de marmoseta y de musaraña presentarán un decremento en el número y en el área de células SOM+ y un incremento en el número y en el área de células GFAP+ en comparación con animales más jóvenes.

5.- Objetivos

5.1.- General

Caracterizar los cambios ontogénicos de diferentes biomarcadores de envejecimiento en cerebros de marmoseta común y de musaraña arborícola.

5.2.- Específicos

- Determinar el número de células SOM+ y GFAP+ en CA1, subiculum y corteza entorrinal de marmoseta común y de musaraña arborícola a sus diferentes edades.
- Determinar el tamaño de las células SOM+ y GFAP+ en CA1, subiculum y corteza entorrinal de marmoseta común y de musaraña arborícola a sus diferentes edades.

6.- Metodología

6.1.- Obtención y características del tejido animal

El estudio se realizó en tejido cerebral *post-mortem* obtenido de *Callithrix jacchus* y *Tupaia belangeri* de diferentes edades (Tabla 1). Los cerebros fueron donados por el Centro Alemán de Primates (DPZ) ubicado en Göttingen, Alemania.

Tabla 1.- Descripción de los sujetos experimentales

Taxonomía	Código	Edad	Grupo de edad asignado
<i>Tupaia belangeri</i>	T14442	2 años, 9 meses, 21 días	Joven
	T13076	3 años, 4 meses, 17 días	Adulto
	T10391	4 años, 9 meses, 13 días	Adulto
	T783	7 años, 5 meses, 14 días	Anciano
	T876	7 años, 10 meses, 0 días	Anciano
	T869	7 años, 11 meses, 16 días	Anciano
<i>Callithrix jacchus</i>	Cj15157	0 años, 0 meses, 0 días	Recién nacido
	Cj13954	1 año, 4 meses, 26 días	Joven
	Cj12285	5 años, 0 meses, 29 días	Adulto
	Cj10374	11 años, 6 meses, 8 días	Anciano
	Cj10215	14 años, 6 meses, 22 días	Anciano

Éstos se fijaron en una solución de PFA para su eventual procesamiento. Posteriormente, fueron expuestos a un gradiente de sacarosa (al 10%, 20% y 30%

durante 24 horas en cada uno) para después realizar cortes coronales de 50 µm para tejido de marmoseta y cortes horizontales de 50 µm para tejido de musaraña. Estos se colectaron en buffer salino de fosfatos (PBS, 1.6% de cloruro de sodio (NaCl, J. T. Baker, No. 3624-01), 0.02% de cloruro de potasio (KCl, J. T. Baker, No. 3040-01), 0.11% de fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄, J. T. Baker, No. 3828-01) y 0.02% de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄, J. T. Baker, No. 3246-01)) se procesaron para la realización de técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra SOM y GFAP (Tabla 2). La obtención de imágenes se llevó a cabo en microscopía confocal.

6.2.- Inmunohistoquímica

6.2.1.- Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio se describen en la tabla 2 y los secundarios en la tabla 3.

Tabla 2.- Anticuerpos primarios utilizados para este estudio

Anticuerpo	Isotipo	Epítotope	Producido en	Referencia
Anti-SOM	IgG	SOM1-14	Conejo	Abcam (ab103790)
Anti-GFAP	IgG	GFAP endógeno	Ratón	CellSignalingTechnology (#3670)

Tabla 3.- Anticuerpos secundarios utilizados en este estudio

Anticuerpo	Isotipo	Epítotope	Producido en	Referencia
Anti-Conejo	IgG	IgG de conejo	Caballo	Vector Labs
Anti-Ratón	IgG	IgG de ratón	Caballo	Vector Labs

6.2.2.- Inmunofluorescencia

Los tejidos se procesaron de la siguiente manera:

1. Reactivación de epítopes:

El tejido fue tratado por 15 minutos con una solución de ácido fórmico (H-COOH, J.T. Baker No. M-28251) concentrado (89.8%) y expuesto a buffer de citratos (SSC Buffer 20x Concentrate SIGMA-ALDRICH, Co. No. S6639-1L) en ebullición durante 10 minutos.

2. Bloqueo de peroxidasa:

Para el bloqueo de la peroxidasa endógena el tejido se puso en contacto con una solución de peróxido de hidrógeno al 1% (H₂O₂, J. T. Baker No. 2186-01), para después proceder al bloqueo de sitios antigénicos utilizando albúmina de suero bovino al 2% (BSA, SIGMA-ALDRICH, Co. No. SLBC8737V) en 0.05 M de tris-buffer salino (TBS, Tris-Base (NH₂C(CH₂OH)₃, SIGMA-ALDRICH, Co. No. 201-064-4), 0.138 M de NaCl y 0.0027 M de KCl) para la inmunofluorescencia contra GFAP y buffer de amplificación para señal de tiramida al 0.5% (TSA, PerkinElmer No. 3GM) en TBS para la inmunofluorescencia contra SOM.

3. Procesamiento del tejido:

El tejido se expuso a tween-20 al 0.05% diluido en buffer de citratos al 10% en agua desionizada (2XSSC-T) para permeabilizarlo.

Se dejó reposando el tejido en la solución de anticuerpo primario dirigido (SOM 1:500 y GFAP 1:500, ver tabla 2) diluido en buffer de bloqueo (TSA para SOM y BSA para GFAP) durante 48 horas a 4°C en agitación constante. Su inmuno-reactividad fue evidenciada utilizando un anticuerpo secundario (anti-conejo 1:500 para SOM y anti-ratón 1:500 para GFAP, ver tabla 3) diluido en el buffer de bloqueo correspondiente según el anticuerpo primario

correspondiente durante 4 horas a temperatura ambiente en agitación constante.

4. Revelado:

El tejido se lavó con una solución de complejo avidina-biotina (A+B, VECTASTAIN ABC System) al 4% en TBS para revelar con cianina-3 (CY3) al 1% en buffer de amplificación (Perkin-Elmer No. NEL704A001KT), dejándolo reposar en este último durante toda una noche a temperatura ambiente en agitación constante.

5. Contraintinción:

Por último, el tejido fue expuesto a una solución 1:500 de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, affymetrix No. 14564 MG) en TBS durante 45 minutos y finalmente se montó con Vectashield (VECTOR No. H-1200).

Es importante destacar que para todos los tejidos se realizaron también controles negativos (misma metodología sin la incubación con el anticuerpo primario) para descartar una posible marca inespecífica.

6.3.- Obtención de imágenes

Las inmunofluorescencias se observaron haciendo uso de microscopía confocal (Leica TCS-SP8 y Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multifotónico). Usando un atlas de cerebro de marmoseta [139] y basándose en las descripciones neuroanatómicas de la musaraña en cortes horizontales [140], se obtuvieron 3 campos en CA1, 3 en subiculum y 3 en corteza entorrinal para cada una de las 3 rebanadas por cada sujeto experimental. Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 20X realizando escaneos ópticos cada 2.07 μm en el eje Z de la platina; éstas se proyectaron y se analizaron en un plano bidimensional observando DAPI (azul) y CY3 (rojo) dado su espectro de emisión (460 nm para DAPI y 565 nm para CY3).

6.4.- Análisis de datos

Cada proyección bidimensional fue analizada en canales separados con un software de procesamiento de imágenes digitales denominado “ImageJ”, en el cual se utilizaron 2 accesorios de programa para efectuar el análisis de cada una de las proyecciones:

- ITCN: Complemento de conteo que hace uso del diámetro celular promedio (promedio de la distancia de un trazo manual de un extremo a otro de la célula), distancia inter-celular mínima (diámetro celular promedio/2) y umbral de detección ($20\% \pm 5\%$) para determinar de manera automatizada el número de células SOM+ y GFAP+.
- Wand: Herramienta de rastreo capaz de detectar el umbral máximo (254-255 pixeles) del cuerpo celular en una proyección y aislarlo del fondo y del marcaje inespecífico para determinar su área en μm^2

6.5.- Análisis estadístico

Se realizó una base de datos en el programa Microsoft Office Excel 2010 con el número de células por campo en una columna y el área promedio de las mismas en otra.

De cada animal se tomaron 3 imágenes de la región de interés por rebanada y se promedió con los datos de 3 rebanadas por animal. Se analizaron los datos con el promedio de los valores que arrojó el promedio por grupo (n=1-3).

Posteriormente, dicha base de datos se analizó con el programa estadístico GraphPad Prism 5, en donde se determinó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA-1-Vía) y pruebas de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$) si las diferencias en tamaño y número de células entre los diversos grupos de edad asignados para una misma especie eran significativas.

7.- Resultados

El presente estudio describe el tamaño relativo y el número de células SOM+ y GFAP+ en CA1, subiculum y corteza entorrinal de marmoseta común y de musaraña arborícola da diferentes edades.

7.1.- Marmoseta común

7.1.1.- SOM

Mediante los protocolos previamente mencionados en la metodología, se logró detectar una señal de inmuno-reactividad específica para SOM en distintas regiones cerebrales para esta especie animal (Figura 3).

- CA1.- El análisis de las imágenes obtenidas muestra un decremento significativo respecto a la cantidad de neuronas SOM+ en CA1 de marmoseta común en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Figura 4A). Además, se observó un aumento significativo en el área relativa del cuerpo celular conforme el animal envejece (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, * $p < 0.05$) (Figura 5A).
- Subiculum.- Se observan también cambios ontogénicos considerables respecto al número de neuronas SOM+ en subiculum de marmoseta común (Figura 4B), donde se describe un decremento significativo de éstas en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$). Además, se observó un incremento significativo dependiente de la edad en el área relativa del cuerpo celular (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, ** $p < 0.01$) (Figura 5B).
- Corteza entorrinal.- Para esta zona se muestran los cambios ontogénicos respecto al número de neuronas SOM+ en cerebros de marmoseta común

(Figura 4C), donde se aprecia un decremento significativo de las mismas en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$). Además, se reporta un incremento significativo en el área relativa del cuerpo celular conforme aumenta la edad del animal (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) (Figura 5C).

Se muestra también el análisis de las 3 zonas en conjunto (CA1, subiculum y corteza entorrinal) para número de neuronas (Figura 4D) y tamaño relativo del cuerpo celular (Figura 5D) con el objetivo de hacer evidente la significancia de los cambios en cerebros de animales ancianos respecto a animales más jóvenes independientemente de la zona de análisis (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

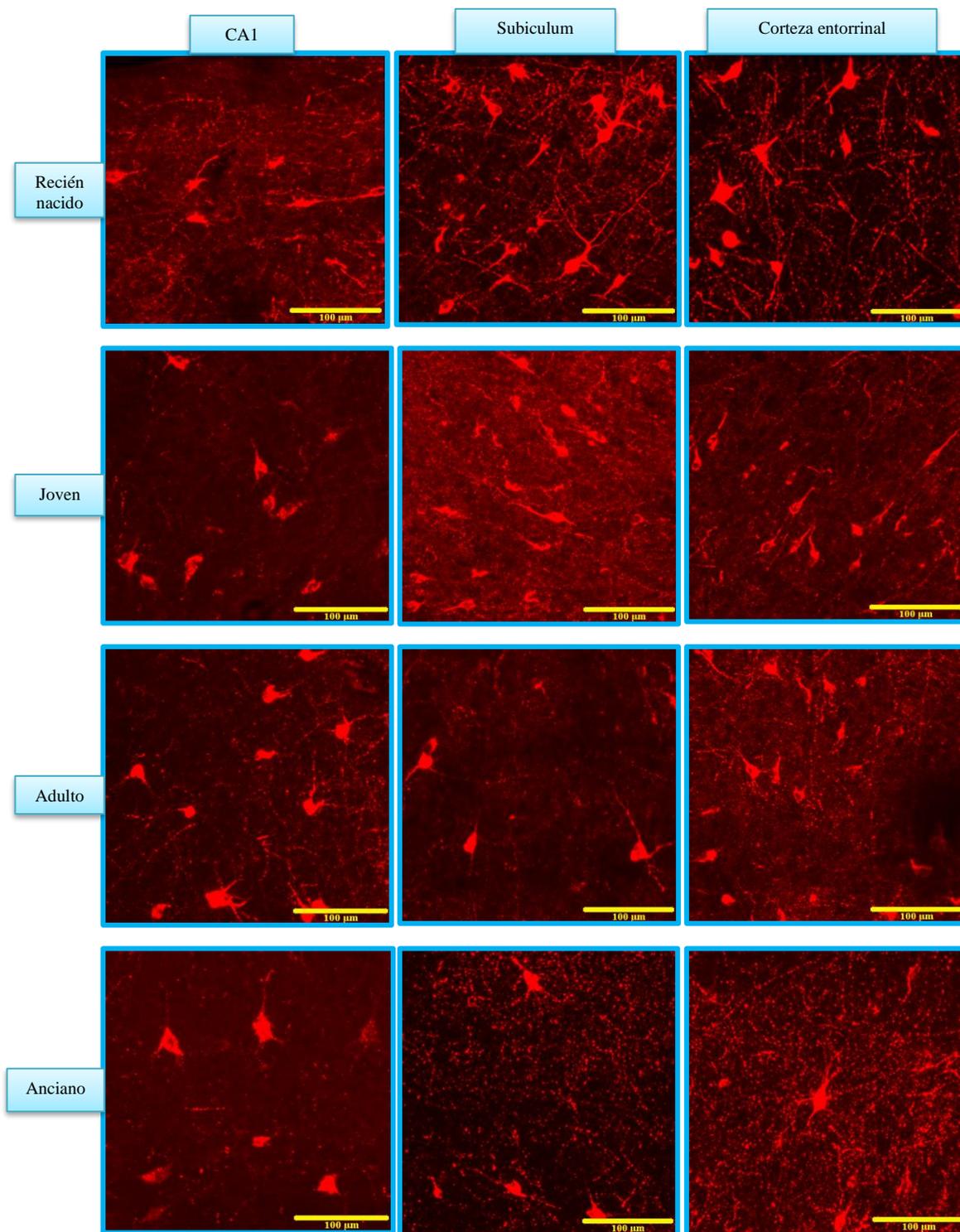


Figura 3.- Neuronas SOM+ en cerebros de marmoseta común.- Es posible apreciar una marca específica contra SOM en CA1, subiculum y corteza entorrinal en cada una de las imágenes que constituyen la figura, siendo evidentes cuerpos neuronales bien definidos. Todas las imágenes fueron tomadas a 20X.

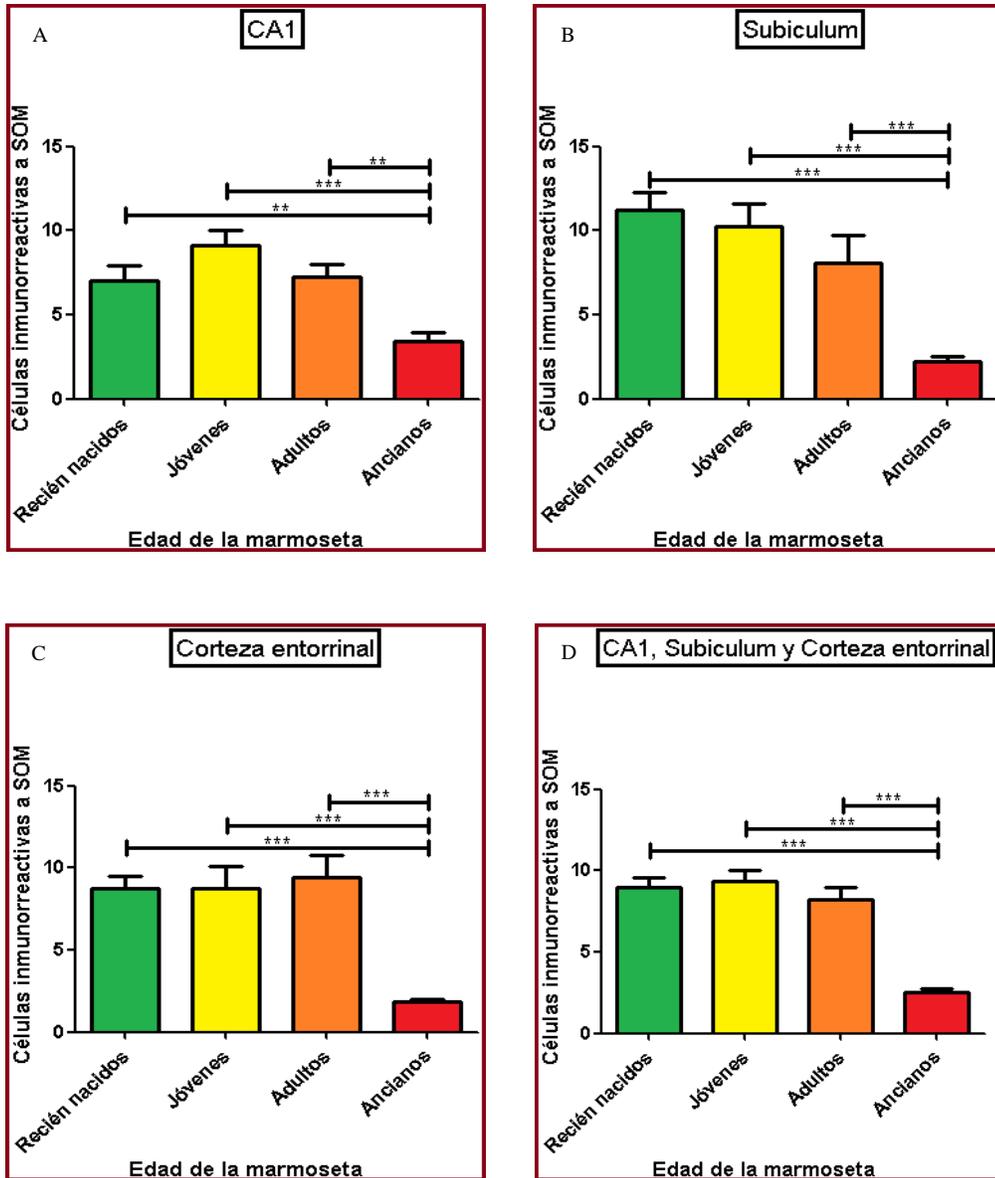


Figura 4.- Conteo de células SOM+.- Se muestra la cantidad de células SOM+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales recién nacidos, jóvenes, adultos y ancianos (eje X). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

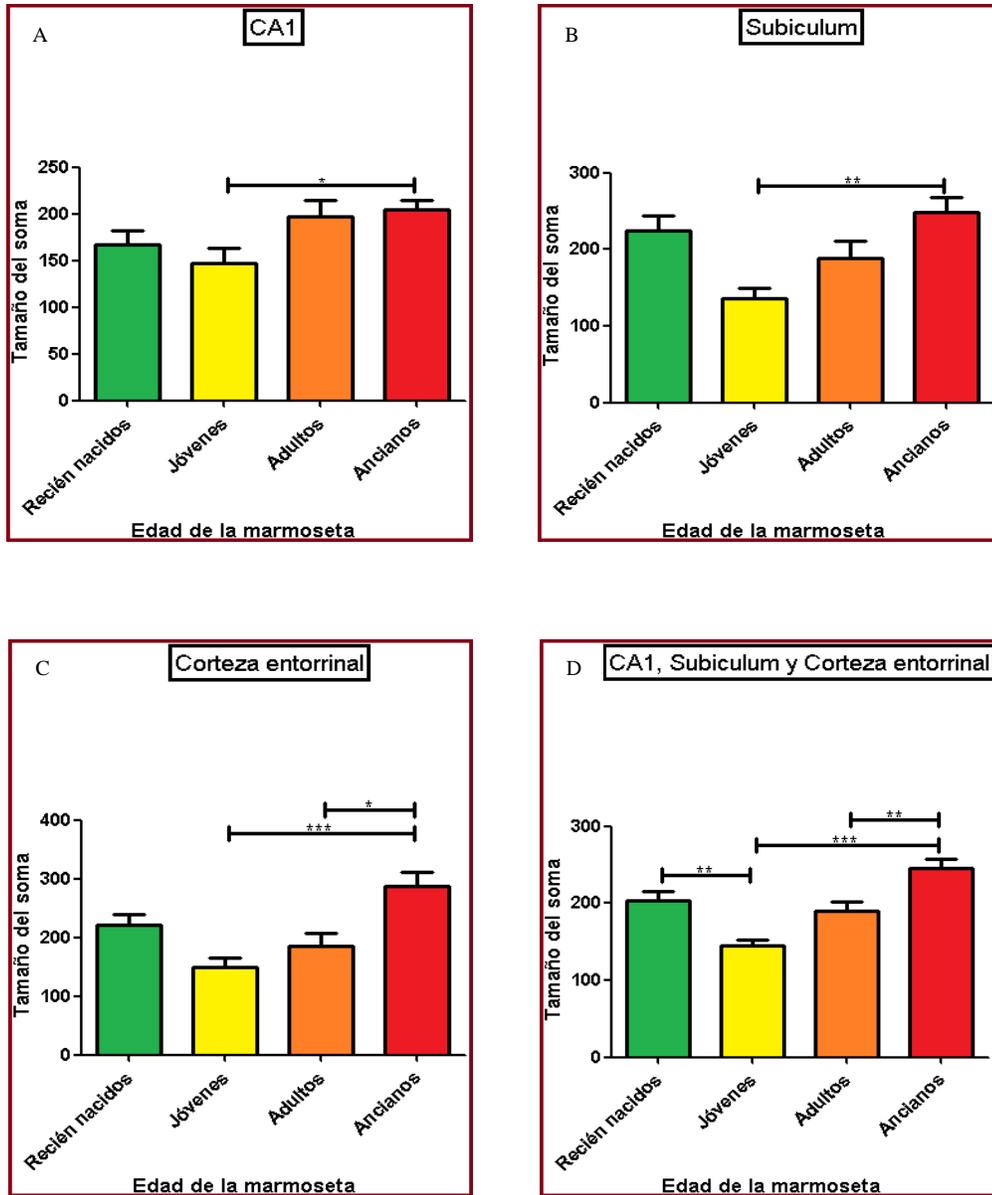


Figura 5.- Tamaño relativo del soma de las neuronas SOM+.- Se muestra el área relativa del cuerpo celular en μm^2 de aquellas neuronas SOM+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales recién nacidos, jóvenes, adultos y ancianos (eje X). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.1.2.- GFAP

Para el caso de GFAP se observó una marca positiva en astrocitos presentes en CA1, subiculum y corteza entorrinal, lo cual quedó evidenciado gracias a su forma estrellada característica (Figura 6). Cabe resaltar que la marca es prácticamente nula para animales recién nacidos.

- CA1.- Se reportan los cambios ontogénicos respecto al número de astrocitos en CA1 de marmoseta común (Figura 7A), donde fue posible observar un incremento significativo en la cantidad de células GFAP+ en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía seguido de Tuckey, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Además, se muestran los cambios dependientes de la edad en el área relativa del cuerpo celular, la cual, al igual que el aumento que se aprecia en el número de células conforme el animal envejece, se aprecia un incremento significativo dependiente de la edad (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, ** $p < 0.01$) (Figura 8A).
- Subiculum.- Fue posible observar un incremento significativo en la cantidad de astrocitos GFAP+ en subiculum de animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$) (Figura 7B). Además, se muestran los cambios dependientes de la edad en el área relativa del cuerpo celular, la cual aumenta significativamente conforme el animal envejece (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$) (Figura 8B).
- Corteza entorrinal.- Para corteza entorrinal fue posible observar un aumento significativo en la cantidad de células GFAP+ en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía seguido de Tuckey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Figura 7C). Para el área relativa del cuerpo celular se aprecia también un incremento significativo dependiente de la edad (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (Figura 8C).

Se muestra también el análisis de las 3 zonas en conjunto (CA1, subiculum y corteza entorrinal) para número de neuronas (Figura 7D) y tamaño relativo del cuerpo celular (Figura 8D) con el objetivo de hacer evidente la significancia de los cambios en cerebros de animales ancianos respecto a animales más jóvenes independientemente de la zona de análisis (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

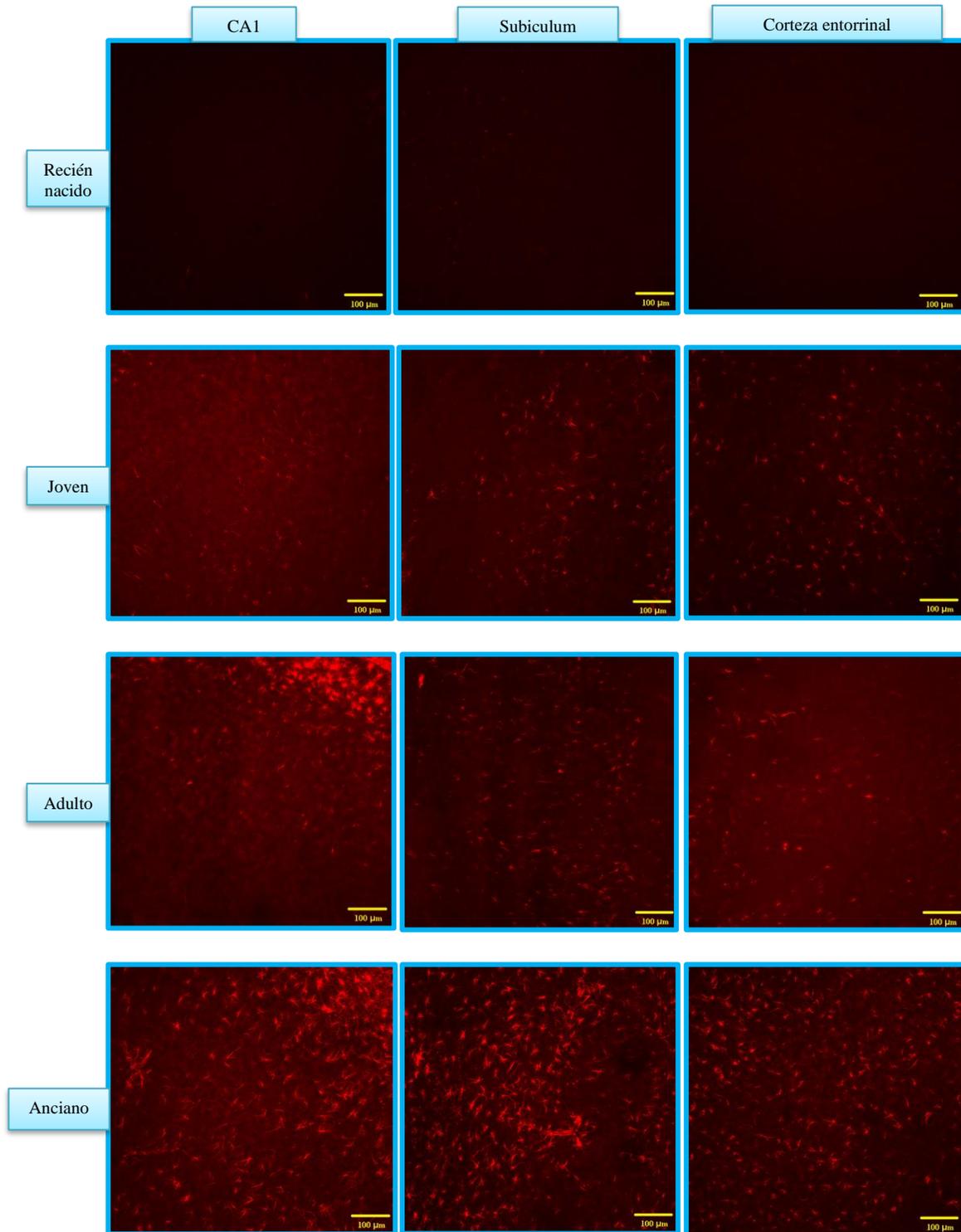


Figura 6.- Astrocitos GFAP+ en cerebros de marmoseta común.- Es posible apreciar una marca específica contra GFAP en CA1, subiculum y corteza entorrinal en las imágenes que constituyen la figura, siendo evidente su forma estrellada característica. Todas las imágenes fueron tomadas a 20X.

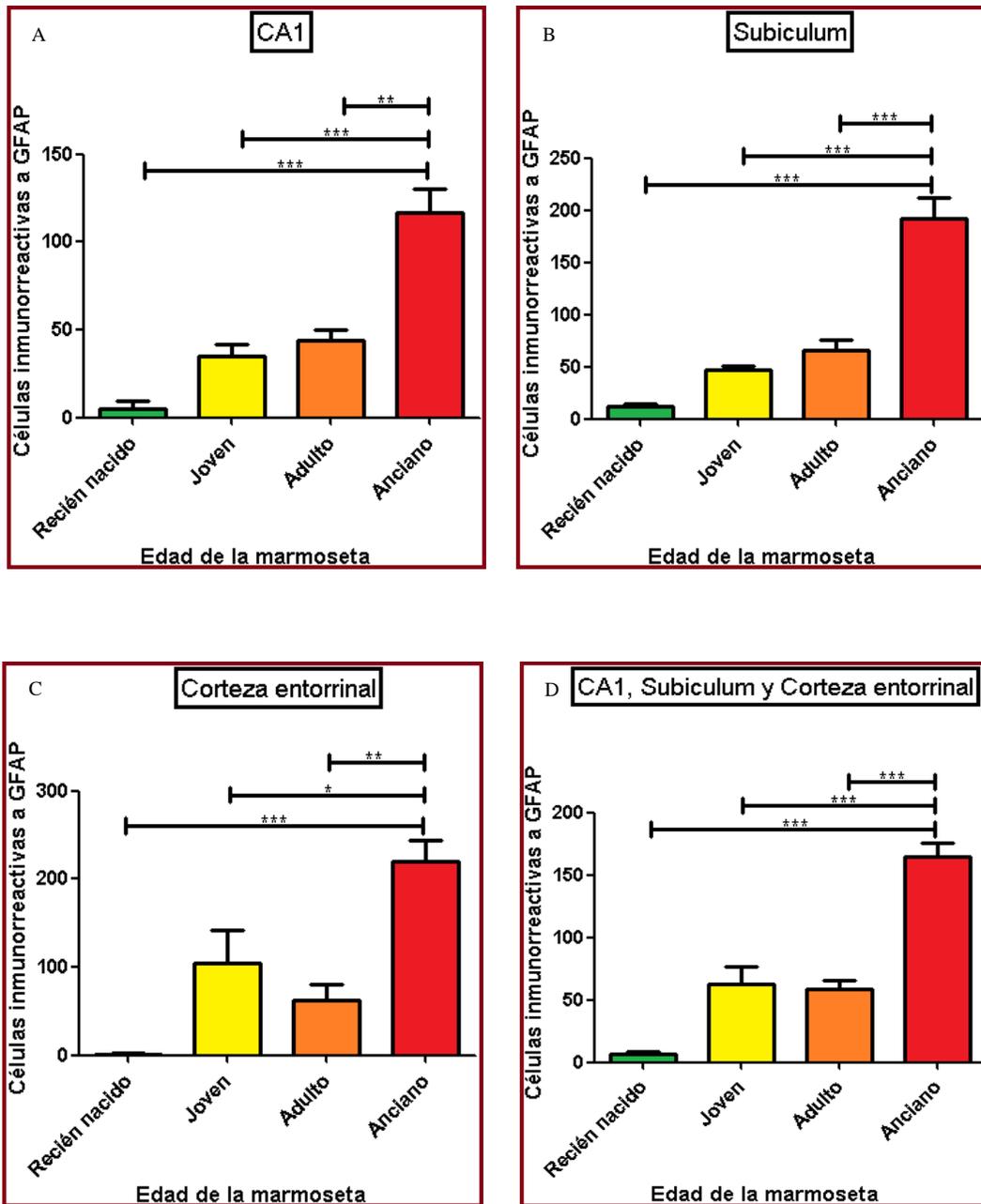


Figura 7.- Conteo de células GFAP+.- Se muestra la cantidad de células GFAP+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales recién nacidos, jóvenes, adultos y ancianos (eje X). * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

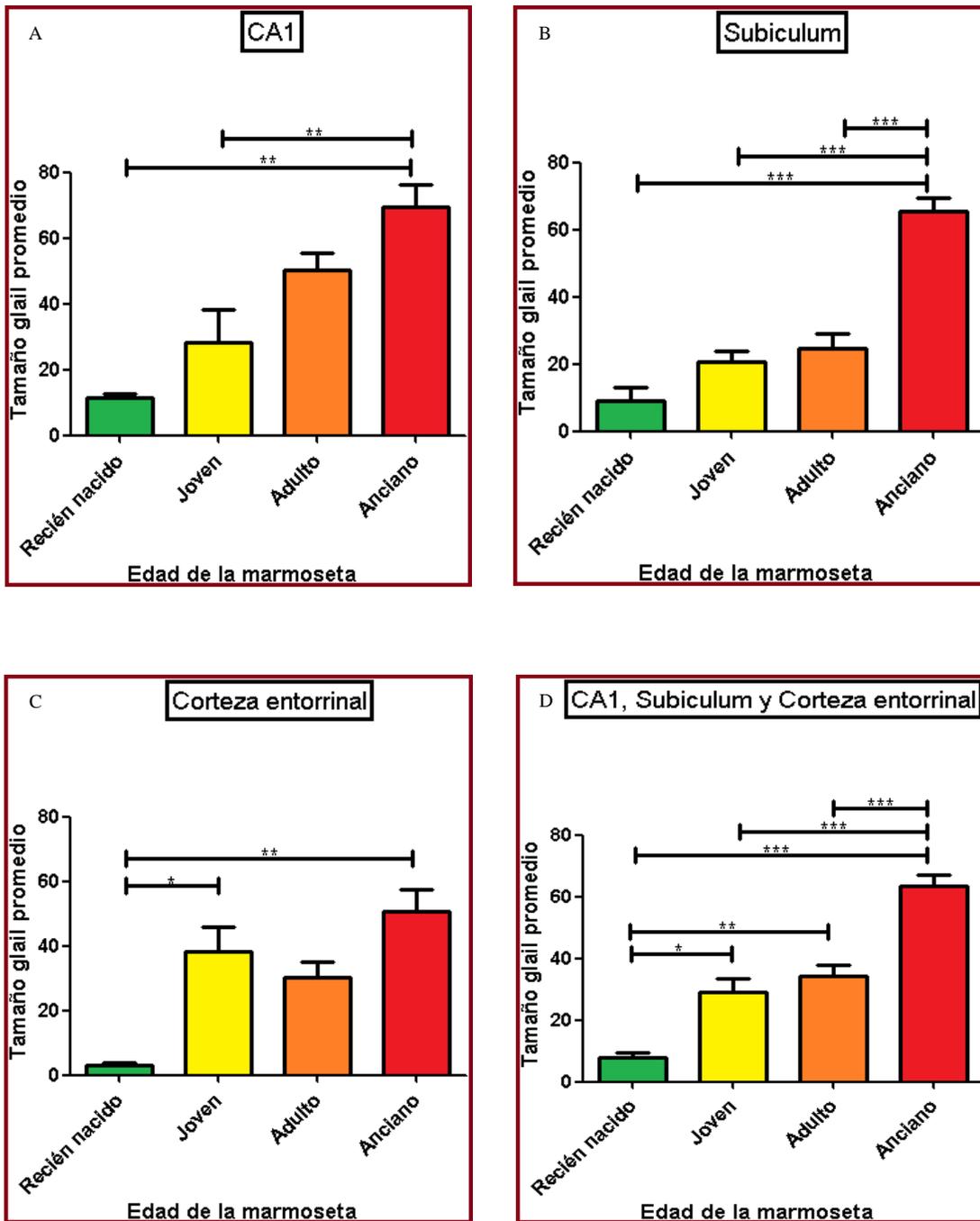


Figura 8.- Tamaño relativo del cuerpo celular de astrocitos GFAP+.- Se muestra el área relativa del cuerpo celular en μm^2 de aquellas neuronas GFAP+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales recién nacidos, jóvenes, adultos y ancianos (eje X). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.2.- Musaraña arborícola

7.2.1.- SOM

Mediante los protocolos previamente mencionados en la metodología, se logró detectar una señal de inmuno-reactividad específica para SOM en distintas regiones cerebrales para esta especie animal (Figura 9).

- CA1.- El análisis de las imágenes obtenidas muestra un decremento significativo respecto a la cantidad de neuronas SOM+ en CA1 de musaraña arborícola en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (Figura 10A). Además, se observó un aumento significativo en el área relativa del cuerpo celular conforme el animal envejece (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) (Figura 11A).
- Subiculum.- Se observan también cambios ontogénicos considerables respecto al número de neuronas SOM+ en subiculum de musaraña arborícola (Figura 10B), donde se describe un decremento significativo de éstas en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Además, se observó un incremento significativo dependiente de la edad en el área relativa del cuerpo celular (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$) (Figura 11B).
- Corteza entorrinal.- Para esta zona se muestran los cambios ontogénicos respecto al número de neuronas SOM+ en cerebros de musaraña arborícola (Figura 10C), donde se aprecia un decremento significativo de las mismas en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$). Además, se reporta un incremento significativo en el área relativa del cuerpo celular conforme aumenta la edad del animal (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$) (Figura 11C).

Se muestra también el análisis de las 3 zonas en conjunto (CA1, subiculum y corteza entorrinal) para número de neuronas (Figura 10D) y tamaño relativo del cuerpo celular (Figura 11D) con el objetivo de hacer evidente la significancia de los cambios en cerebros de animales ancianos respecto a animales más jóvenes independientemente de la zona de análisis (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

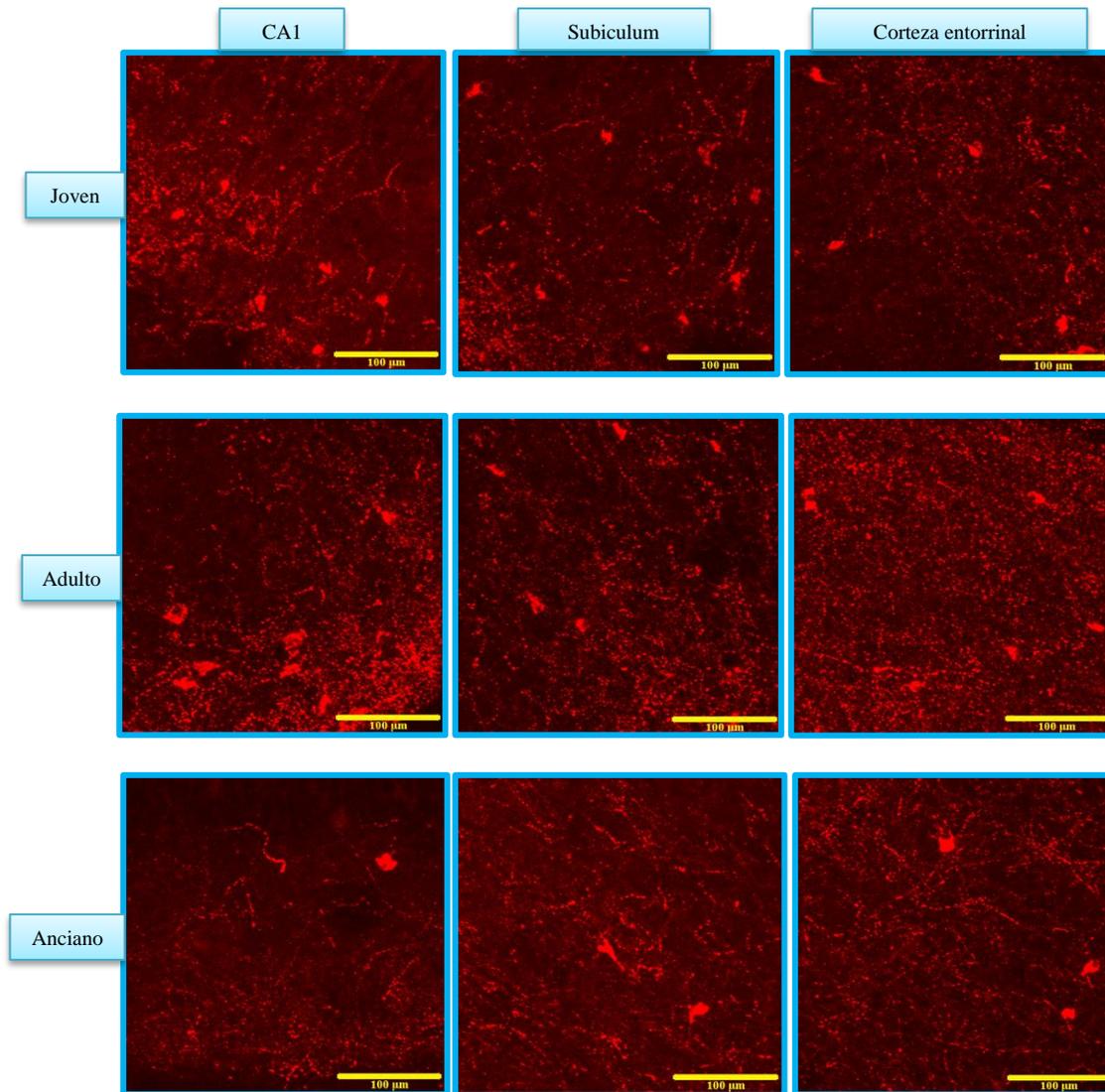


Figura 9.- Neuronas SOM+ en cerebros de musaraña arborícola.- Es posible apreciar una marca específica contra SOM en CA1, subiculum y corteza entorrinal en cada una de las imágenes que constituyen la figura, siendo evidentes cuerpos neuronales bien definidos. Todas las imágenes fueron tomadas a 20X.

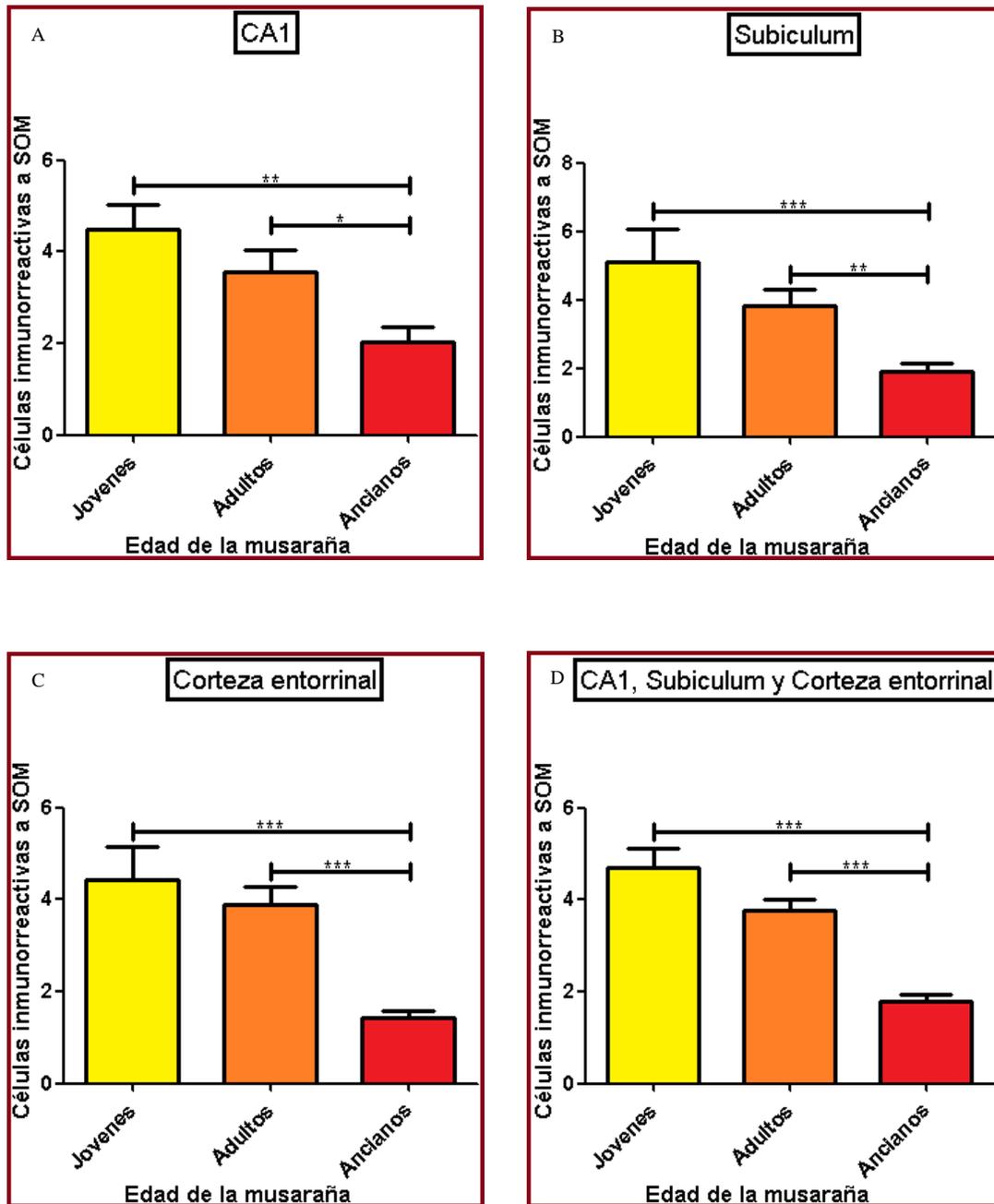


Figura 10.- Conteo de células SOM+.- Se muestra la cantidad de células SOM+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales jóvenes, adultos y ancianos (eje X). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

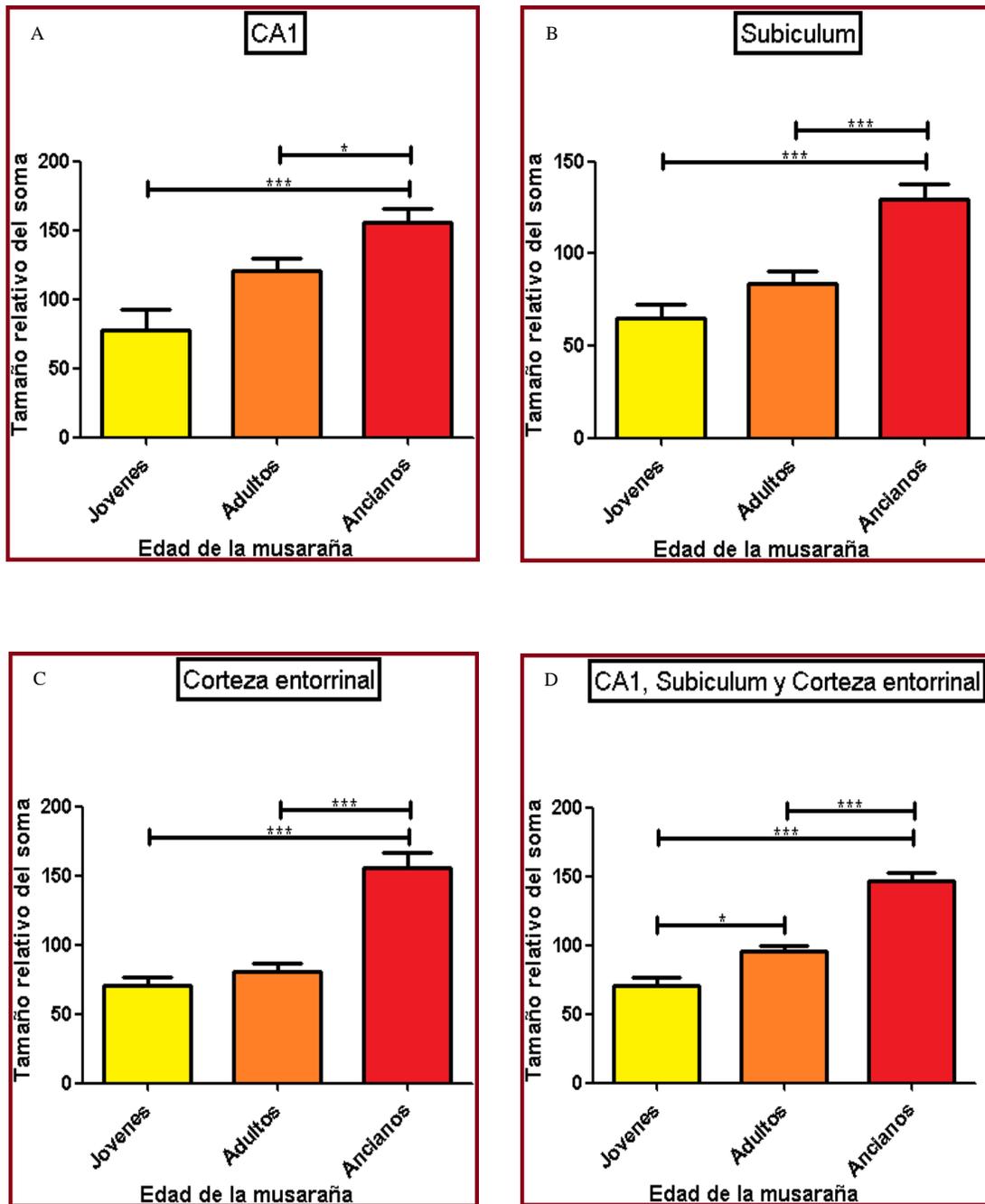


Figura 11.- Tamaño relativo del soma de las neuronas SOM+.- Se muestra el área relativa del cuerpo celular en μm^2 de aquellas neuronas SOM+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales, jóvenes, adultos y ancianos (eje X). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

7.2.2.- GFAP

Para el caso de GFAP se observó una marca positiva en astocitos presentes en CA1, subiculum y corteza entorrinal, para cerebros de musaraña arborícola (Figura 12).

- CA1.- Se reportan los cambios ontogénicos respecto al número de astrocitos en CA1 de musaraña arborícola (Figura 13A), donde fue posible observar un incremento significativo en la cantidad de células GFAP+ en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía seguido de Tuckey, $**p<0.01$, $***p<0.001$). Además, se muestran los cambios dependientes de la edad en el área relativa del cuerpo celular, la cual, al igual que el aumento que se aprecia en el número de células conforme el animal envejece, se aprecia un incremento significativo dependiente de la edad (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, $***p<0.001$) (Figura 14A).
- Subiculum.- Fue posible observar un incremento significativo en la cantidad de astrocitos GFAP+ en subiculum de animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía seguido de Tuckey, $***p<0.001$) (Figura 13B). Además, se muestran los cambios dependientes de la edad en el área relativa del cuerpo celular, la cual aumenta significativamente conforme el animal envejece (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, $***p<0.001$) (Figura 14B).
- Corteza entorrinal.- Para corteza entorrinal fue posible observar un aumento significativo en la cantidad de células GFAP+ en animales ancianos respecto a animales más jóvenes (Anova-1-Vía seguido de Tuckey, $***p<0.001$) (Figura 13C). Para el área relativa del cuerpo celular se aprecia también un incremento significativo dependiente de la edad (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, $***p<0.001$) (Figura 14C).

Se muestra también el análisis de las 3 zonas en conjunto (CA1, subiculum y corteza entorrinal) para número de neuronas (Figura 14D) y tamaño relativo del cuerpo

celular (Figura 14D) con el objetivo de hacer evidente la significancia de los cambios en cerebros de animales ancianos respecto a animales más jóvenes independientemente de la zona de análisis (Anova-1-Vía, seguido de Tuckey, *** $p < 0.001$).

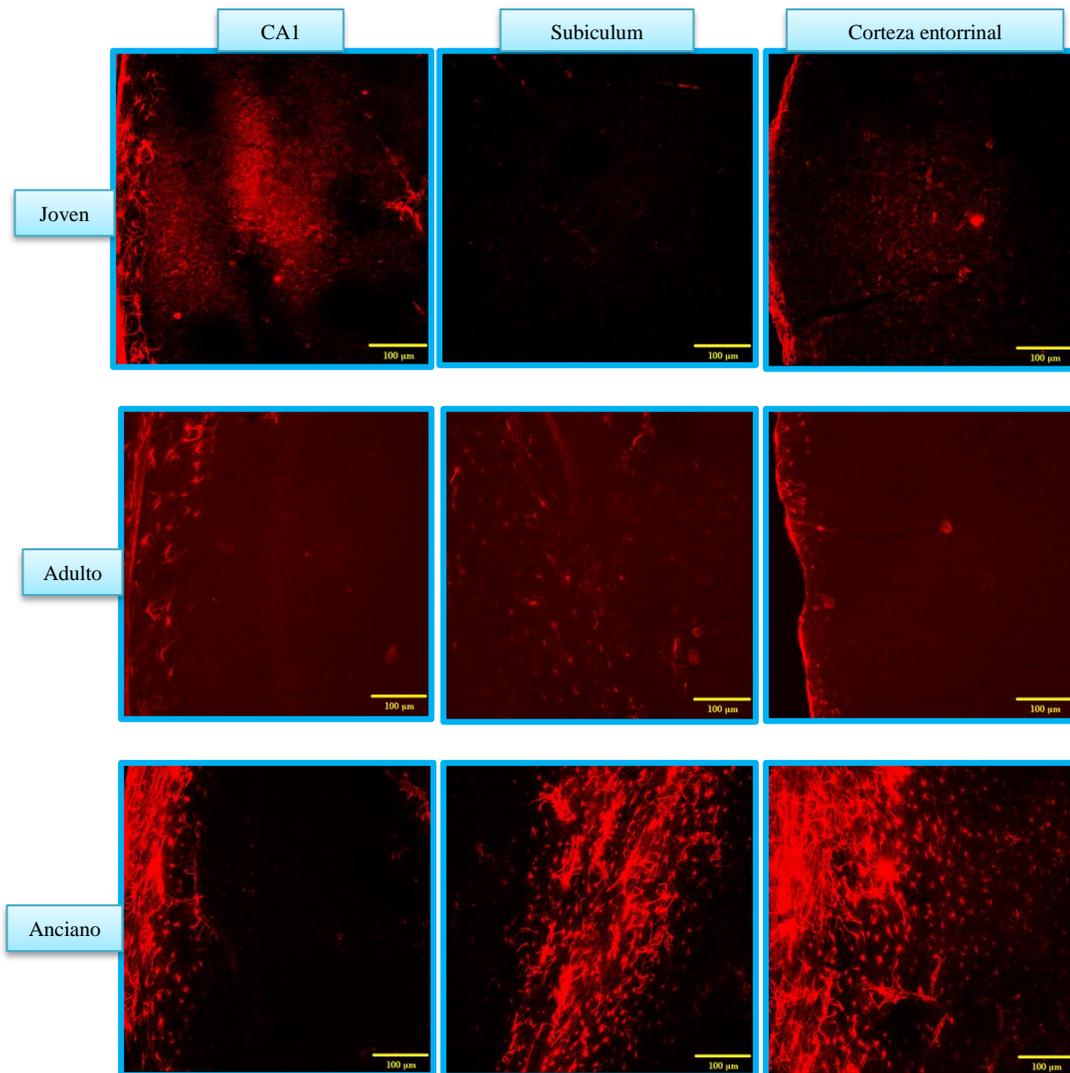


Figura 12.- Astroctitos GFAP+ en cerebros de musaraña arborícola.- Es posible apreciar una marca específica contra GFAP en CA1, subiculum y corteza entorrinal en las imágenes que constituyen la figura, siendo evidente su forma estrellada característica. Todas las imágenes fueron tomadas a 20X.

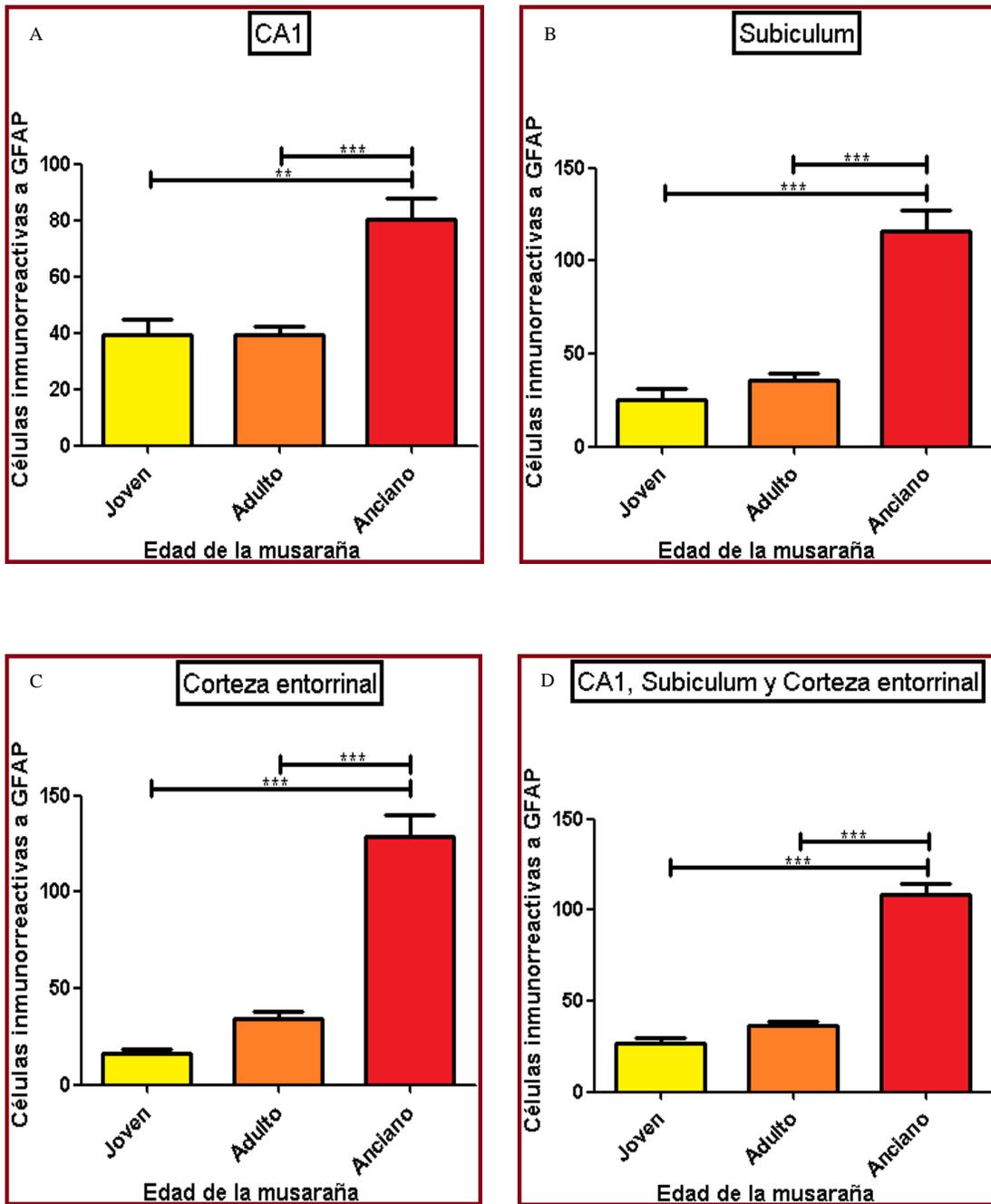


Figura 13.- Conteo de células GFAP+.- Se muestra la cantidad de células GFAP+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales jóvenes, adultos y ancianos (eje X). **p<0.01, ***p<0.001.

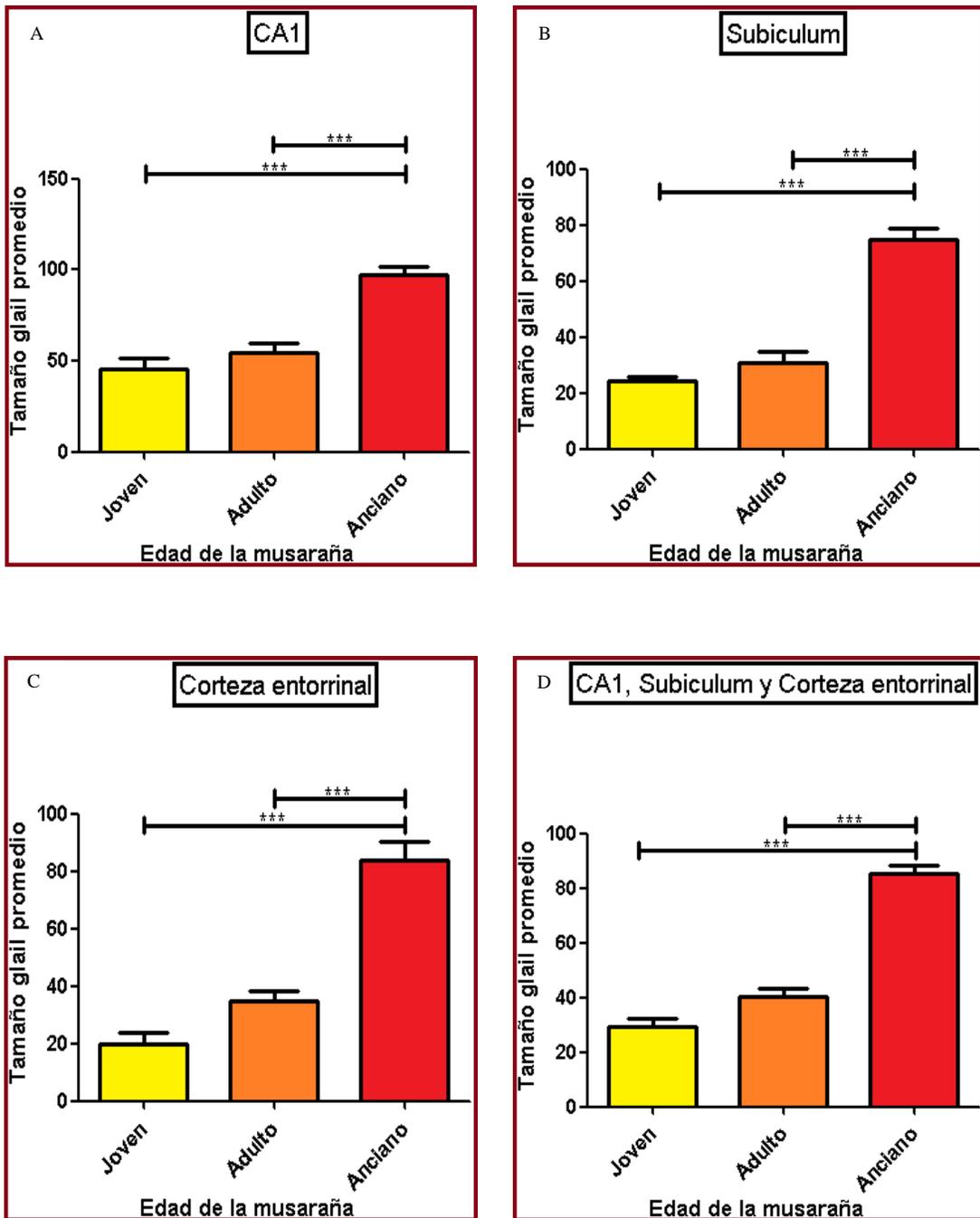


Figura 14.- Tamaño relativo del cuerpo celular de astrocitos GFAP+.- Se muestra el área relativa del cuerpo celular en μm^2 de aquellas neuronas GFAP+ (eje Y) en CA1 (A), subiculum (B), corteza entorrinal (C) y en las 3 zonas en conjunto (D) para animales recién nacidos, jóvenes, adultos y ancianos (eje X). *** $p < 0.001$.

8.- Discusión

8.1.- SOM

Los resultados reportan por primera vez una clara pérdida dependiente de la edad en el número de neuronas somatostatinérgicas en CA1, subiculum y corteza entorrinal para estas dos especies animales.

Estos datos coinciden con trabajos en los cuales se ha observado una disminución dependiente de la edad en células somatostatinérgicas [102], [104]. Además, Oullet y Villers-Sidani reportaron en 2014 fluctuaciones en el número de interneuronas positivas a SOM, así como también una disminución en el número total de neuronas inhibitorias durante el periodo post-natal (desde los 9 días de edad) en corteza auditiva primaria de rata [141]; además, se ha documentado también un decremento cerebral dependiente de la edad en la expresión de este neuropéptido para modelos murinos [104]. Otros estudios citan que no hay disminución dependiente de la edad en los niveles de SOM en líquido cefalorraquídeo [142], sin embargo, una pérdida de neuronas positivas a un neuropéptido no necesariamente habla de una disminución en la cantidad del mismo en un determinado compartimiento fisiológico.

Esta disminución en el número de células SOM+ sugiere que existe un proceso de neurodegeneración relacionado con el envejecimiento, lo cual concuerda con una disminución en los niveles de calbindina en el número de neuronas colinérgicas en cerebros de marmosetas viejas [120], así como también con una acumulación amiloidea en diversas regiones cerebrales para esta misma especie [118]. Para el caso de la musaraña arborícola se ha reportado acumulación amiloidea cerebral, tanto del péptido 1-40 como del 1-42 [130]. A pesar de haberse sugerido a la neurodegeneración como una característica intrínseca del envejecimiento [143], aún existe debate respecto a si este proceso es o no fisiológica y conductualmente significativo [53], [136].

Se analizó también el área relativa promedio de las células SOM+, respecto a lo cual existen pocos estudios al respecto. En cerebro de rata se han reportado diferencias en el tamaño neuronal dependiendo de la zona en la cual se esté cuantificando este parámetro [144], además de haberse buscado ya cambios dependientes de la edad sin encontrar resultados significativos [145].

Este es el primer reporte sobre cambios ontogénicos en el área neuronal relativa de este tipo de neuronas SOM+. A pesar de que aún se desconoce la cascada de eventos responsables de este incremento, se propone que esto se puede deber a una compensación ante la pérdida de neuronas SOM+, donde pudiesen estar involucrados mecanismos como lo son regulaciones a la baja en la secreción de somatotropina y desbalances en circuitos inhibitorios.

El estudio de Yamashita y colaboradores en el 2012 reporta una marca positiva a placas seniles SOM+ para cerebros de musarañas y de macacos japoneses [135], lo cual está estrechamente relacionado con nuestros resultados debido a que también se sugiere una alteración homeostática directamente relacionada con este neuropéptido. Además, en este mismo estudio se observa degeneración en la morfología neuronal de aquellas células SOM+ y proponen un ensanchamiento de las mismas debido en gran medida a la presencia de vacuolas [135].

Cabe mencionar que, a diferencia de humanos y de primates no humanos, en modelos murinos no se observan cambios dependientes de la edad en el tamaño relativo de las células SOM+ [146], lo cual sugiere que son específicos para primates y especies relacionadas [135].

8.2.- GFAP

Una de las características más importantes de la astrogliosis es un incremento en la cantidad de microglía activa [147], que puede identificarse con marcadores

específicos como lo es la proteína GFAP [83]. En el presente trabajo, se reporta un aumento dependiente de la edad en el número de astrocitos GFAP+ en CA1, subiculum y corteza entorrinal en cerebros de marmoseta común y de musaraña arborícola a diferentes edades.

Estos resultados concuerdan con los reportes que se tienen en la literatura sobre el incremento en los procesos de neuroinflamación y astrogliosis en senescencia, los cuales citan cambios como aumento en la expresión microglial de interleucina-1 α en humanos [85], aumento en la expresión de antígenos relacionados al complejo mayor de histocompatibilidad clase 2 en primates no humanos [86] y cambios morfológicos y transiciones fenotípicas de las células microgliales en roedores [87].

Se sugiere que estos cambios pudieran explicarse como una respuesta a los cambios encefálicos que se hacen presentes durante el proceso de senescencia como lo son distrofia [87], estrés oxidativo y neurodegeneración [84] o a diversas influencias ambientales como dieta, actividad física y actividad mental, así como también a procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas e infecciones [84].

Si bien aún está a debate si la activación microglial (lo cual incluye proliferación celular, cambios morfológicos e incremento en su expresión de GFAP [83]), constituye o no un proceso perjudicial; el haber observado un aumento tan claro en el número de astrocitos activos para cerebros viejos de marmoseta común y de musaraña arborícola, sugiere que ambas especies constituyen buenos modelos animales para el estudio de la neuro-inflamación durante el envejecimiento.

En lo que al tamaño de los astrocitos se refiere, los resultados concuerdan con reportes que citan cambios morfológicos y transiciones fenotípicas dependientes de la edad en células microgliales de roedores [87]. El aumento tanto en el número, así como en el tamaño de las células gliales en cerebros viejos se había reportado ya desde 1974, gracias a un trabajo en el cual Vaughan y Peters describieron estos cambios en corteza cerebral de rata haciendo uso de microscopía electrónica.

Cabe también resaltar que los resultados obtenidos en este trabajo con ambos marcadores (SOM y GFAP) son congruentes entre sí debido a que, además de concordar con la bibliografía, la neuroinflamación que plantean estos datos (aumento en el número y en el tamaño de células GFAP+) pudiera estar estrechamente relacionada con la neurodegeneración que sugiere el decremento en el número de neuronas positivas a SOM mediante mecanismos como el estrés oxidativo y adaptación en respuesta a los múltiples cambios acumulados que acarrea el envejecimiento.

9.- Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente proyecto respaldan nuestra hipótesis de trabajo que indica que existirán alteraciones en la cantidad de células somatostatinérgicas y de astrocitos en sujetos viejos, sugiriendo que ambos marcadores están relacionados con procesos de senescencia.

10.- Perspectivas

1. Se podría correlacionar la presencia de los marcadores evaluados en este trabajo con el historial clínico de los animales.
2. Sería interesante evaluar la presencia otras zonas cerebrales (e. g. CA3), con el objetivo de poder discriminar la especificidad de nuestros cambios en una proyección con respecto a otra.
3. Se recomienda continuar con la caracterización de las etapas ontogénicas en marmoseta y musaraña para identificar el momento preciso en que estos marcadores se hacen presentes, así como correlacionarlos con funciones neuronales.
4. Se espera comparar los resultados ontogénicos de estas 2 especies con tejido cerebral humano sano y enfermo para determinar si los cambios se relacionan con envejecimiento natural o con eventos neurodegenerativos.

11.- Referencias

- [1] López-Otín C., Blasco M., Partridge L., Serrano M. y Kroemer G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153, pp. 1194-1207.
- [2] Robins C. y Conneely K. (2014). Testing evolutionary models of senescence: traditional approaches and future directions. *Hum Genet*, pp. 1492-1497.
- [3] Medawar P. (1952). An unsolved Problem of Biology. *HK Lewis, London*.
- [4] Williams G. (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence *Evolution*, 11, pp. 398-411.
- [5] Kirkwood T. (1977). Evolution of Ageing. *Nature*, 270, pp. 301-304.
- [6] Bowling A. y Dieppe P. (2005). What is successful ageing and who should define it?. *BMJ*, 331, pp. 1548-1551.
- [7] Brigeiro M. (2005). "Envejecimiento exitoso" y "tercera edad": Problemas y retos para la promoción de la salud. *Invest Educ Enferm*, 23, pp. 102-109.
- [8] Boss G. y Seegmiller E. (1981). Age-Related Physiological Changes and Their Clinical Significance. *Geriatric Medicine*, 135, pp. 434-440.
- [9] Jani B. y Rajkumar C. (2012). Ageing and vascular ageing. *Postgrad Med J*, 82, pp. 357-362.
- [10] Davies D. and Shock N. (1949). Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J Clin Invest*, 29, pp. 496-507.
- [11] Hollenberg N., Adams D., Solomon H., Rashid A., Abrams H. y Merrill J. (1974). Senescence and the renal vasculature in normal man. *Circ Res*, 34, pp. 309-316.
- [12] Madsen J. y Graff J. (2004). Effects of ageing on gastrointestinal motor function. *Age ageing*, 33, pp. 154-159.
- [13] Ren W., Wu K., Li X., Luo M., Liu H., Zhang., S. y Hu Y. (2014). Age-related changes in small intestinal mucosa epithelium architecture and epithelial tight junction in rat models. *Aging Clin Exp Res*, 26, pp. 183-191.

- [14] Ware J., Dockery D. y Louis T. (1990). Longitudinal and cross-sectional estimates of pulmonary function decline in never-smoking adults. *Am J Epidemiol*, 132, pp. 685-700.
- [15] Loeser R. y Delbono O. (2009). Aging of the Muscles and Joints. En J. Halter, J. Ouslander, M. Tinetti, S. Studenski, K. High y S. Asthana. *Geriatric Medicine and Gerontology* (pp. 1355-1368). United States of America: McGraw-Hill.
- [16] Branch J., Rosano C. y Studenski S. (2009). Mobility. En J. Halter, J. Ouslander, M. Tinetti, S. Studenski, K. High y S. Asthana. *Geriatric Medicine and Gerontology* (pp. 1397-1409). United States of America: McGraw-Hill.
- [17] Galvin J. (2009). Mental Status and Neurological Examination in Older Adults. En J. Halter, J. Ouslander, M. Tinetti, S. Studenski, K. High y S. Asthana. *Geriatric Medicine and Gerontology* (pp. 153-169). United States of America: McGraw-Hill.
- [18] Panza F., Solfrizzi V., Giannini M., Seripa D., Pilotto A. y Lodroscino G. (2014). Nutrition, frailty, and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, pp. 1-6.
- [19] Fried L., Tangen C., Walston J., Newman A., Hirsch C. y Gottdiener J., (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*, 56, pp. M146–M156.
- [20] Kelaiditi E., van Kan G. y Cesari, M. (2014). Frailty: role of nutrition and exercise. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 17, pp. 32–39.
- [21] Harman, D. (1965). The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. *J. Gerontol*, 20, pp. 151–153.
- [22] Gilad, G. y Gilad, V. (1995) Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech. Ageing Dev*, 78, pp. 75–83.
- [23] Gemma C., Vila J., Bachstetter A. y Bickford P. (2007). Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. En D. Riddle. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. (Capítulo 15). CRC Press.

- [24] Dei R., Takaeda A., Niwa H., Lim M., Nakagomi Y., Watanabe M., Inagaki T., Washimi Y., Yasuda T., Horie K., Miyata T. y Sobue G. (2002). Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 104, pp. 113-122.
- [25] Chang J. y Liu L. (1999). Manganese potentiates nitric oxide production by microglia. *Brain Res Mol Brain Res*, 68, pp. 22-28.
- [26] Dringen R. (2005). Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal*, 7, 1223-1233.
- [27] Blalock E., Grondin R. y Chen K. (2010). Aging-related gene expression in hippocampus proper compared with dentate gyrus is selectively associated with metabolic syndrome variables in rhesus monkeys. *J Neurosci*, 30, pp. 6058-6071.
- [28] Craft S. y Watson G. (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol*, 3, pp. 169-178.
- [29] De la monte S. y Wands J. (2005). Review of insulin and insulin-growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 7, pp. 45-61.
- [30] Cersosimo E. y DeFronzo R. (2006). Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev*, 22, pp. 423-436.
- [31] Hennenberg N., y Hoyer S. (1995). Desensitization of the neuronal insulin receptor: a new approach in the etiopathogenesis of lateonset sporadic dementia of the Alzheimer type (SDAT)? *Arch Gerontol Geriatr*, 21, pp. 63-74.
- [32] Zhao W., Chen H., Quon M. y Alkon D. (2004). Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*, 490, pp. 71-81.
- [33] Shingenaga M., Hagen T. y Arnes B. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, pp. 10771-10778.
- [34] Lemaitre H., Goldman A., Sambataro F., Verchinski B., Meyer-Lindenberg A.,

- Weinberger D. y Mattay V. (2012). Normal age-related brain morphometric changes: nonuniformity across cortical thickness, surface area and gray matter volume?. *Neurobiology of Aging*, 33, pp. 617.e1-617.e9.
- [35] Raz N., Gunning-Dixon F., Head D., Dupuis J. y Acker J. (1998). Neuroanatomical correlates of cognitive aging: evidence from structural magnetic resonance imaging. *Neuropsychology*, 12, pp. 95-114.
- [36] Du A., Schuff N., Chao L., Kornak J., Jagust W., Krammer J., Reed B., Miller B., Norman D., Chui H. y Weiner M. (2006). Age effects on atrophy rates of entorhinal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 27, pp. 733-740.
- [37] Verhaeghen P., Marcoen A., y Goosen L. (1993). Facts and fiction about memory aging: a quantitative integration of research findings. *J. Gerontol*, vol. 48 (4), pp. 157-171.
- [38] Rusinek H., De Santi S., Frid D., Tsui W., Tarshish C., Convit A. y de Leon M. (2003). Regional brain atrophy rate predicts future cognitive decline: 6-year longitudinal MR imaging study of normal aging. *Radiology*, 229 (3) pp. 691-696.
- [39] Svennerholm L., Boström K. y Jungbjer B. (1997). Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol*, 94, pp. 345-352.
- [40] Scahil R., Frost C. y Jenkins R. (2003). A longitudinal study of brain volume changes in normal ageing using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol*, 60, pp. 989-994.
- [41] Brody H. (1955). Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 102, 511-516.
- [42] Smith D., Roberts J., Gage F. y Tuszynski M. (1999). Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, pp. 10893-10898.
- [43] Smith D., Rapp P., McKay H., Roberts J. y Tuszynski M. (2004). Memory Impairment in Aged Primates Is Associated with Focal Death of Cortical

- Neurons and Atrophy of Subcortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24, pp. 4373-4381.
- [44] Fuchs E., y Flügge G. (2014). Adult Neuroplasticity: More Than 40 Years of Research. *Hindawi Publishing Corporation*, pp. 1-10.
- [45] Rakic P., (1985), Limits of neurogenesis in primates. *Science*, pp. 1054–1056.
- [46] Eriksson P., Perfilieva E. y Björk T. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4, pp. 1313–1317.
- [47] Dickstein D., Weaver C., Luebke J. y Hof P. (2012). Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience*, 251, pp. 21-32.
- [48] Nakamura S., Akiguchi I., Kameyama M. y Mizuno N. (1985). Age-related Changes of Pyramidal Cell Basal Dendrites in Layer III and V of Human Motor Cortex: A quantitative Golgi Study. *Acta Neuropathol (Berl)*, 65, pp. 281-284.
- [49] Duan H., Wearne S., Rocher A., Macedo A., Morrison J. y Hof P. (2003). Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb cortex*, 13, pp. 950-961.
- [50] Uemura E. (1985). Age-related changes in the subiculum of *Macaca mulatta*: synaptic density. *Exp. Neurol*, 87, pp. 403–411.
- [51] Mattson M. y Magnus T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature*, 7, pp. 278-294.
- [52] Mattson M. (2009). Cellular and Neurochemical Aspects of the Aging Human Brain. En J. Halter, J. Ouslander, M. Tinetti, S. Studenski, K. High y S. Asthana. *Geriatric Medicine and Gerontology* (pp. 739-750). United States of America: McGraw-Hill.
- [53] Burke S. y Barnes C. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature*, 7, pp. 30-40.
- [54] Hindle J. (2010). Ageing, Neurodegeneration and Parkinson´s disease. *Age and Ageing*, 39, pp. 156-161.
- [55] van Praag H., Kempermann G. y Gage F. (2000) Neuronal consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*, 1, pp. 191-198.

- [56] Pham T., Winblad B., Granholm A. y Mohammed A. (2002). Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 73, pp. 167-175.
- [57] Mora F., Segovia G., del Arco A., de Blas M. y Garrido P. (2012). Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res*, 1476, pp. 71-85.
- [58] Hibberd C., Yau J. y Seckl J. (2000). Glucocorticoids and the aging hippocampus. *J Anat*, 197, pp. 553-562.
- [59] Thibault, O. y Landfield, P. (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science*, 272, pp. 1017–1020.
- [60] Toescu, E., Verkhratsky, A. y Landfield, P. (2004). Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci*, 27, pp. 614–620.
- [61] Foster, T. y Norris, C. (1997). Age-associated changes in Ca²⁺-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, 7, pp. 602–612.
- [62] Kentaro T., Miyuki M., Takumi A., Tsutomu H., Takashi T., Michinori I., Haruyasu Y. y Akihiko T. (2002). Neurodegeneration with Tau Accumulation in a Transgenic Mouse Expressing V337M Human Tau. *The Journal of Neuroscience*, 22, pp. 133-141.
- [63] Johnson G. y Stoothoff W. (2004). Tau Phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*, 117, pp. 5721-5729.
- [64] O'Brien R. y Wong P. (2011). Amyloid Precursor Protein and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci*, 34, pp. 185-204.
- [65] Mattson M., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I. y Rydel R. (1992). Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, 12, pp. 376-389.
- [66] Shankar G., Bloodgood B. y Townsend M. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*,

27, pp. 2866–2875.

- [67] Reddy P. y Beal M. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Cell*, 14, pp. 45-53.
- [68] Nabeshima T. y Nitta A., (1994). Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats. *Tohoku J Exp Med*, 174, pp. 241-249.
- [69] Weingarten M., Lockwood A., Hwo S. y Kirschner M. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci*, 72, pp. 1858-1862.
- [70] Lindwall G. y Cole R. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, 259, pp. 5301-5305
- [71] Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y., Zaidi M. y Wisniewski H. (1986) Microtubule-associated protein tau: a component of Alzheimer paired helical filaments, *J. Biol. Chem*, 261 pp. 6084 – 6089.
- [72] Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Wisniewski H. y Binder L. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci*, 261, pp. 6084 – 6089.
- [73] Lee V., Balin B., Otvos L. y Trojanowski J. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau, *Science* 251, pp. 675 – 678.
- [74] Iqbal K., del C. Alonso A., Chen S., Chohan M., El-Akkad E., Gong C., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., Tanimukai H. y Grundke-Iqbal I. (2005). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739 pp. 198-210.
- [75] Matsuo E., Shin R., Billingsley M., Van deVoorde A., O'Connor M., Trojanowski J. y Lee V. (1994). Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau, *Neuron* 13, pp. 989–1002.
- [76] Wang J., Wu Q., Smith A., Grundke-Iqbal I. y Iqbal K. (1998). Tau is

phosphorylated by GSK-3 at several sites found in Alzheimer disease and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase. *FEBS Lett*, 436, pp. 28-34.

- [77] Carlyle B., Nairna A., Wangb M., Yangb Y., Jinb L., Simena A., Ramosa B., Bordnera K., Crafta G., Daviesc P., Pletikosb M., Sestanb N., Arnstenb A. y Paspalasb C. (2014). cAMP-PKA phosphorylation of tau confers risk for degeneration in aging association cortex. *PNAS*, 111, pp. 5036-5041
- [78] Conley K., Marcinek D. y Villarin J. (2007). Mitochondrial dysfunction and age. 10, pp. 688-692.
- [79] Melov S., Adlard P., Morten K., Johnson F., Golden T., Hinerfeld D., Schilling B., Mavros C, Masters C., Volitakis I., Li Q., Laughton K., Hubbard A., Cherny R., Gibson B. y Bush A. (2007). Mitochondrial Oxidative Stress Causes Hyperphosphorylation of Tau. *PLoS ONE*, 2, pp. e536.1-e536.2.
- [80] Zheng W., Bastianetto S., Mennicken F. Ma W. y Kar S. (2002). Aβ peptide induces Tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal culture. *Neuroscience*, 115, pp. 201-211.
- [81] Purves D. (2004). Studying the Nervous Systems of Humans and Other Animals. En G. Augustine. *Neuroscience* (pp. 1-28). United States of America: Sinauer Associates, Inc.
- [82] Dehouck M., Meresse S., Delorme P., Fruchart J. y Cecchelli R. (1990) An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem*, 54, pp. 1798-1801.
- [83] Dong Y. y Benveniste E. (2001). Immune Function of Astrocytes. *GLIA*, 36, pp. 180-190.
- [84] Streit W., Xue Q., Tischer J. y Bechmann I. (2014). Microglial pathology. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, pp. 1-17.
- [85] Sheng J., Mrak R. y Griffin W. (1998). Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol*, 95, pp. 229-234.

- [86] Sheffield L. y Berman N. (1998). Microglial expression of MHC class II increases in normal aging of nonhuman primates. *Neurobiol Aging*, 19, pp. 47–55.
- [87] Morgan T., Xie Z., Goldsmith S., Yoshida T., Lanzrein A., Stone D., Rozovsky I., Perry G., Smith M. y Finch C. (1999). The mosaic of brain glial hyperactivity during normal ageing and its attenuation by food restriction. *Neuroscience*, 89 pp. 687–699.
- [88] Hensley K., (2010). Neuroinflammation in Alzheimer’s Disease: Mechanisms, Pathologic Consequences, and Potential for Therapeutic Manipulation. *J Alzheimers Dis.*21, pp. 1-14.
- [89] Howcroft TK, Campisi J, Louis GB, Smith MT, Wise B, Wyss-Coray T, Augustine AD, McElhaney JE, Kohanski R, Sierra F (2013). The role of inflammation in age-related disease. *Aging*, 5, pp. 84–93.
- [90] Norden D y Godbout J. (2013) Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39, pp. 19–34.
- [91] Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G., Cooper N., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B., Finch C., Frautschy S., Griffin W., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrazek R., Mackenzie I., McGeer P., O’Banion M., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strohmeyer R. y Tooyoma I. (2000) Inflammation and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*, 21, pp. 383–421.
- [92] Epelbaum J. (1986). Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog. Neurobiol*, 27, pp. 63–100.
- [93] Chun Lin L. y Sibille e. (2013). Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target?. *Frontiers in Pharmacology*, 4, pp. 1-12.
- [94] Martel G., Dutar P., Epelbaum J. y Viollet C. (2012). Somatostatinergic systems: an update on brain functions and pathological aging. *Front*

Endocrinol, 3, pp. 1-15.

- [95] Viollet C., Lepousez G., Loudes C., Videau C., Simon A. y Epelbaum J. (2008). Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. *Mol. Cell. Endocrinol*, 286, pp. 75–87.
- [96] Tahvildari B., Wölfel M., Duque A. y McCormick D. (2012). Selective functional interactions between excitatory and inhibitory cortical neurons and differential contribution to persistent activity of the slow oscillation. *J. Neurosci*, 32, pp. 12165–12179.
- [97] Jinno S., Klausberger T., Marton L. F., Dalezios Y., Roberts J. D. y Fuentealba P. (2007). Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J. Neurosci*, 27, pp. 8790–8804.
- [98] Baratta M., Lamp T. y Tallent M. K. (2002). Somatostatin depresses long-term potentiation and Ca²⁺ signaling in mouse dentate gyrus. *J. Neurophysiol*, 88, pp. 3078–3086.
- [99] Tallent M. y Siggins G. (1997). Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *J. Neurophysiol*, 78, pp. 3008–3018.
- [100] Grilli M., Raiteri L. y Pittaluga A. (2004). Somatostatin inhibits glutamate release from mouse cerebrocortical nerve endings through presynaptic sst2 receptors linked to the adenylyl cyclase-protein kinase A pathway. *Neuropharmacology*, 46, pp. 388–396.
- [101] Galarraga E., Vilchis C., Tkatch T., Salgado H., Tecuapetla F. y Perez-Rosello T. (2007). Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience*, 146, pp. 537–554.
- [102] Miettinen R., Sirviö J., Riekkinen P. Sr., Laakso M., Riekkinen M. y Riekkinen P. Jr. (1993). Neocortical, hippocampal and septal parvalbumin- and somatostatin-containing neurons in young and aged rats: correlation with passive avoidance and water maze performance. *Neuroscience*, 53, pp. 367-378.

- [103] Florio T., Ventra C., Postiglione A. y Schettini G. (1991). Age-related alterations of somatostatin gene expression in different rat brain areas. *Brain Res*, 557, pp. 64-68.
- [104] Vela J. Gutiérrez A., Victórica J. y Ruano D. (2003). Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J. Neurochem*, 85, pp. 368-377.
- [105] Hayashi M., Yamashita A. y Shimizu K. (1997). Somatostatin and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the primate brain: decreased levels of mRNAs during aging. *Brain Research*, 749, pp. 283-289.
- [106] Davies P., Katzman R. y Terry R. (1980). Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature*, 288, pp. 279-280.
- [107] Tamminga C., Foster N., Fedio P., Bird E. y Chase T. (1987). Alzheimer's disease: low cerebral somatostatin levels correlate with impaired cognitive function and cortical metabolism. *Neurology*, 37, pp. 161-165.
- [108] Burgos-Ramos E., Hervás Aguilar A., Puebla-Jiménez L., Boyano-Adánez M. y Arilla Ferreiro E. (2007). Chronic but not acute intracerebroventricular administration of amyloid beta-peptide (25-35) decreases somatostatin content, adenylylase activity, somatostatin-induced inhibition of adenylylase activity, and adenylylase I levels in the rat hippocampus. *J Neuroscience Res*, 85, pp. 433-442.
- [109] Stanley E., Fadel J. y Mott D. (2012). Interneuron loss reduces dendritic inhibition and GABA release in hippocampus of aged rats. *Neurobiol Aging*, 33, pp. 431.e1-431-e13.
- [110] Hasty P. y Vijg J. (2004). Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity. *Aging cell*, 3, pp. 55-65.
- [111] Vanhooren V. y Liebert C. (2013). The mouse as novel organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12, pp. 8-21.

- [112] Gershoff S. (1993). Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements?. *Nutrition Review*, 51, pp. 313-326.
- [113] Cavallotti C., Artico M., Pescosolido M. y Feher J. (2001). Age-related changes in rat retina. *Jpn J Ophthalmol*, 45, PP. 68-75.
- [114] Mendelson W., Bergmann B. (1999). Age-related changes in sleep in the rat. *Sleep*, 15, pp. 145-150.
- [115] Ross C., Davis K., Dobek G. y Tardif S. (2011). Aging Phenotypes of Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *Journal of Aging Research*, 2012, pp. 1-6.
- [116] Heuer E., Rosen R., Cintron A. y Walker L. (2012). Nonhuman Primate Models of Alzheimer-Like Cerebral Proteopathy. *Curr Pharm Des*, 18, pp. 1159-1169.
- [117] Tardif S., Smucny D., Abbott D., Mansfield K., Schultz-Darken N. y Yamamoto M. (2003). Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comparative Medicine*, 53, pp. 364–368.
- [118] Geula C., Nagykerly N., y Wu C. (2002) Amyloid- β deposits in the cerebral cortex of the aged common marmoset (*Callithrix jacchus*): incidence and chemical composition. *Acta Neuropathologica*, 103, pp. 48–58.
- [119] Maclean C., Baker H., Ridley R. y Mori H. (2002). Naturally occurring and experimentally induced beta-amyloid deposits in the brains of marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neural Transm*, 107, pp. 799-814.
- [120] Wu C., Naqykerly N., Hersh L., Scinto L. y Geula C. (2003). Selective age-related loss of calbindin-D28k from basal forebrain cholinergic neurons in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience*, 120, pp. 249-259.
- [121] Leuner B., Kozorovitskiy Y., Gross G. y Gould E. (2007). Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp. 17169–17173.
- [122] Epple G. Comparative studies on vocalization in marmoset monkeys (*Hapalidae*). *Folia Primat*, 8, pp. 1–40.
- [123] Tardif S., Mansfield K., Ratnam R., Ross C. y Ziegler T. (2011). The Marmoset

as a Model of Aging and Age-Related Diseases. *ILAR J*, 52, pp. 54-65.

- [124] Melchers B., Philippens I., Proeling T. y Bruijnzeel P. (2000). Behavioral test systems in marmoset monkeys. *Behavior Research Methods. Instruments. & Computers*. 32, pp. 173-179.
- [125] Eslamboli A., (2005). Marmoset monkey models of Parkinson's disease: Wich model, when and why?. *Brain Research Bulletin*, 68, pp. 140-149.
- [126] Kendall A., Rayment F. y Torres E. (1998). Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nat Med*, 4, pp. 727-729.
- [127] Genain C. y Hauser S. (1997). Creation of a model for multiple sclerosis in *Callithrix jacchus* marmosets. *J Mol Med*, 75 pp. 187-197.
- [128] Iwanami A., Yamane J., Katoh H. (2005). Establishment of graded spinal cord injury model in a non-human primate: the common marmoset. *J Neurosci Res*, 80, pp. 172-181.
- [129] Okano H., Hikishima K., Iriki A. y Sasaki E. (2012). The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 17, pp. 336-340.
- [130] Yamashita A., Fuchs E., Taira M. y Hayashi M. (2010). Amyloid Beta (A β) Protein- and Amyloid Precursor Protein (APP)- Immunoreactive Structures in the Brains of Aged Tree Shrews. *Current Aging Science*, 3, pp. 1-9
- [131] Gross-Clark W. (1956) . The antecedents of man. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [132] Raina S., Faith J., Disotell T., Seligmann H., Stewart C. y Pollock D. (2005) Evolution of base-substitution gradients in primate mitochondrial genomes. *Genome Res*, 15, 665-673.
- [133] Waddell P., Kishino H. y Ota R. (2001). A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics. *Genome Inform*, 12, 141-154.
- [134] Fuchs E. (1999). Tree shrews in UFAW Handbook of the Care and Management of Laboratory Animals. Oxford: Blackwell, pp. 235-245.
- [135] Yamashita A., Fuchs E., Taira M., Yamamoto T. y Hayashi M. (2012).

Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques. *J Med Primatol*, 41, pp. 147-157.

- [136] Keuker J., Biurrun G., Luiten P. y Fuchs E. (2004). Preservation of Hippocampal Neuron Numbers and Hippocampal Subfield Volumes in Behaviorally Characterized Aged Tree Shrews. *The Journal of Comparative Neurobiology*, 468, pp. 509-517.
- [137] Keuker J., Neijse J., Nyakas C., Luiten P. y Fuchs E. (2005). Aging is accompanied by a subfield-specific reduction of serotonergic fibers in the tree shrew hippocampal formation. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 30, pp. 221-229.
- [138] Albon J., Farrant S., Akhtar S., Young R., Boulton M., Smith G., Taylor M., Guggenheim J. y Morgan J. (2007). Connective tissue structure of the tree shrew optic nerve and associated ageing changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, pp. 2134-2144.
- [139] Paxinos G., Watson C., Petrides M., Rosa M. y Tokuno H. (2012). The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates.
- [140] Keuker J., Rochford C., Witter M. y Fuchs E. (2003). A cytoarchitectonic study of the hippocampal formation of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26 pp. 1-15.
- [141] Oullet L., Villers-Sidani E. (2014). Trajectory of the main GABAergic interneuron populations from early development to old age in the rat primary auditory cortex. *Front Neuroanat*, 8.
- [142] Atack J., Beal M., May C., Kaye J., Mazurek M., Kay A. y Rapoport S. (1988). Cerebrospinal fluid somatostatin and neuropeptide Y. Concentrations in aging and in dementia of the Alzheimer type with and without extrapyramidal signs. *Arch Neurol*, 45, pp. 269-274.
- [143] Hung C., Chen Y., Hsieh W., Chiou S. y Kao C. (2010) Ageing and neurodegenerative diseases. Elsevier, 9S, pp. S37-S46.

- [144] Meitzen J, Pflipsen KR, Stern CM, Meisel RL, Mermelstein PG. (2011). Measurements of neuron soma size and density in rat dorsal striatum, nucleus accumbens core and nucleus accumbens shell: differences between striatal region and brain hemisphere, but not sex. *Neurosci Lett*, 487 pp. 177-181.
- [145] Engelmann G., Richardson A., Katz A. y Fierer J. (1981). Age-related changes in isolated rat hepatocytes. Comparison of size, morphology, binucleation, and protein content. *Mech Ageing Dev*, 16, pp. 385-395.
- [146] Loerch P., Lu T., Dakin K., Vann J., Isaacs A., Geula C., Wang J., Pan Y., Gabuzda D., Li, C., Prolla T. y Yankner B. (2008). Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS One*, 3.
- [147] Mrazek R., Griffin S. y Graham D. (1997). Aging-associated changes in human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, pp. 1269–1275.