



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

MAESTRÍA EN CIENCIAS COGNITIVAS

ALZHEIMER Y ENVEJECIMIENTO.

Correlato entre el estado cognitivo y la proliferación de precursores neuronales en un modelo ex vivo.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO/A
EN CIENCIAS COGNITIVAS

P R E S E N T A:

Claudia Ivonne Mejía Mondragón

Director de tesis: Dra. Gloria Benítez King

Co Tutor: Markus Franziskus Müller Bender

Comité Tutorial:

-Dr. Germán Octavio López Riquelme.

-Dra. Rosalinda Guevara Guzmán.

-Dr. Antonio García Anacleto

Cuernavaca, Morelos

Marzo, 2019

TABLA DE CONTENIDO.

Glosario de abreviaturas.

Resumen.

1. Antecedentes.

1.1 Enfermedad de Alzheimer.

1.2 Alzheimer y pruebas olfativas.

1.3 Neurogénesis.

1.4 Neurogénesis en el epitelio olfatorio.

2. Justificación.

3. Preguntas de investigación.

4. Hipótesis.

5. Objetivos.

6.1 Materiales y métodos.

6.1 Población de estudio.

6.1.1 Criterios de selección.

6.1.2 Tamaño de Muestra:

6.2 Obtención de la muestra.

6.2.1 Cultivo celular.

6.2.2 Sembrado celular para experimentación.

6.2.3 Inmunofluorescencia de doble marcaje.

7. Resultados.

7.1 Del ingreso al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

7.2 De las evaluaciones realizadas dentro del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

7.3 Resultados de los test Minimental de los pacientes.

7.3.1 Interpretación del resultado atendiendo a la edad y el nivel de estudios.

7.4 Resultados de las resonancias magnéticas de los pacientes.

8. Determinación del número de núcleos teñidos con DAPI en los cultivos, de pacientes y sus controles.

8.1 Determinación del número de células Ki-67 positivas en los cultivos, de pacientes y sus controles.

9. Discusión.

10. Conclusiones.

11. Referencias.

Glosario de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AJ	Adulto joven.
AM	Adulto mayor.
AZ	Pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer.
BrdU	Bromodeoxiuridina.
BSA	Bovine serum albumin/ albúmina sérica bovina.
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole/ 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCL	Deterioro Cognitivo Leve.
DMEM-F12	Dulbecco's modified Eagle Medium/Nutrient Mixtures F12
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders/ Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.
EA	Enfermedad de Alzheimer.
EDTA	Ethane-1,2-diyldinitrilo) tetraacetic acid/ ácido etilendiaminotetraacético.
FDDNP	2- (1- {6 - [(2- [flúor-18] fluoroetil) (metil) amino] -2-naftil} - etilideno) malononitrilo.

FITC	Fluorescein isothiocyanate/ Isotiocianato de fluoresceína.
INPRFM	Instituto Nacional De Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.
NEO	Neuroepitelio olfatorio.
ORN	Olfactory receptor neuron/ Neurona receptora olfatoria.
PBS	Phosphate buffered Saline/ Buffer de fosfato salino.
PVA	Polyvinyl alcohol / alcohol polivinílico
SFB	Suero Fetal Bovino.
SNC	Sistema Nervioso Central.
SVZ	Subventricular zone/Zona subventricular.

RESUMEN

El sentido del olfato humano es considerado por muchos como un sentido del pasado, pues se dice que cuando el ser humano adoptó una postura erguida alejó la nariz de la tierra donde se originan la mayor parte de los olores y donde están los aromas más intensos. Esta adaptación al medio dio paso al desarrollo de otros sentidos como la vista o el oído, de tal forma que el olfato se utilizó menos por el *homo erectus*. Además, el estudio del sentido del olfato también se fue opacando por la abundante investigación en torno al resto de los sentidos.

Actualmente, es posible distinguir dos hipótesis sobre la relación del olfato con el envejecimiento y las demencias. La primera de ellas plantea que el decremento en la percepción e identificación olfatoria es una consecuencia del envejecimiento. Mientras que la segunda propone que la disminución en la percepción e identificación olfatoria puede ser un signo que antecede al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En ambos casos, el deterioro del sentido del olfato se ha asociado con un decremento de la capacidad cognitiva. Las estructuras involucradas en el proceso de olfacción tienen una cercanía anatómica con el hipocampo que es la estructura cerebral donde se integra la cognición, por lo que se ha sugerido que la afectación en una de estas estructuras puede repercutir en la otra.

En la enfermedad de Alzheimer, además del hipocampo se afectan amplias áreas de la corteza cerebral y sus síntomas involucran una cognición que se empobrece acompañada de cambios conductuales. Por lo anterior y debido a que las personas con enfermedades neurodegenerativas presentan déficits olfatorios, en años recientes las pruebas olfativas se han propuesto como una herramienta de diagnóstico temprano *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer ya que hasta ahora se hace en cerebros obtenidos *post mortem*.

Estudios histopatológicos de cerebros con esta enfermedad han demostrado la acumulación de formas insolubles de la proteína β amiloide en espacios extracelulares, así como la organización alterada de la proteína tau en ovillos neurofibrilares en el citoplasma de las neuronas. Estas alteraciones estructurales eventualmente causan apoptosis y en consecuencia una disminución en el volumen del cerebro.

El neuroepitelio olfatorio es un tejido en donde el proceso neurogénico se lleva a cabo de manera constitutiva durante toda la vida. Este tejido conserva características bioquímicas y funcionales del sistema nervioso central por lo que se ha propuesto como un modelo subrogado para el estudio de las enfermedades neuropsiquiátricas. Tomando en cuenta lo anterior en este trabajo determinamos la tasa de proliferación de precursores neuronales obtenidos del neuroepitelio olfatorio de 2 pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (AZ) y dos sujetos controles sin antecedentes psiquiátricos en dos etapas diferentes de la vida adulta: Un adulto mayor (AM) y un adulto joven (AJ). Las tasas de proliferación se correlacionaron con el funcionamiento cognitivo general evaluado con la prueba “*test Mini-Mental State*” así como con los resultados de la imagen cerebral obtenida por resonancia magnética de los pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer.

Los resultados obtenidos del grupo femenino mostraron que la tasa de proliferación de los pacientes con AZ es menor que la tasa de proliferación de un adulto mayor y aún menor que la del adulto joven. Estos datos se correlacionaron con un puntaje menor obtenido en la prueba del *minimal* (aplicado a los participantes con AZ) y con la disminución del volumen cortical subcortical supratentorial y del hipocampo revelado por la resonancia magnética, lo que sugiere que la condición de los precursores neuronales obtenidos del epitelio olfatorio si podrían estar representando el estado y funcionamiento de estructuras cerebrales más profundas como el hipocampo, y por ende alteraciones en el estado cognitivo.

Desde este punto de vista tiene sentido afirmar que la percepción e identificación olfatoria serían un signo que antecede al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, pues una tasa menor de proliferación sugiere que el recambio de neuronas receptoras olfativas es deficiente, por lo que no se garantiza el funcionamiento óptimo del olfato. Finalmente, la relación entre los resultados de las resonancias magnéticas y las alteraciones en la proliferación de pacientes con AZ, evidencian que el neuroepitelio olfatorio es un modelo subrogado sobresaliente del sistema nervioso central y óptimo para el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas.

ANTECEDENTES

1.1 Enfermedad de Alzheimer

En 1906 el neuropatólogo y psiquiatra alemán Alois Alzheimer describió por primera vez lo que actualmente se conoce como Enfermedad de Alzheimer (EA) (Korolev, 2014).

Esta enfermedad fue descrita en sus inicios como una condición demencial y su estudio se basó en los hallazgos en el caso de Auguste Deter, una mujer de 51 años que manifestaba síntomas de deterioro progresivo en la memoria y en el lenguaje, así como en aspectos psicosociales, además de presentar desorientación y síntomas conductuales como son las alucinaciones, el delirio y paranoia (Korolev, 2014).

Después de 4 años Auguste D. murió y su cerebro fue concedido al Dr. Alois Alzheimer para su estudio; Este observó que el tamaño y peso del cerebro de Auguste era menor al normal, como si se hubiera consumido (Molloy & Caldwell, 2002). Además, en la descripción histopatológica el Dr. Alzheimer describió cambios peculiares en las neurofibrillas (Maurer, Volk & Gerbaldo, 1997).

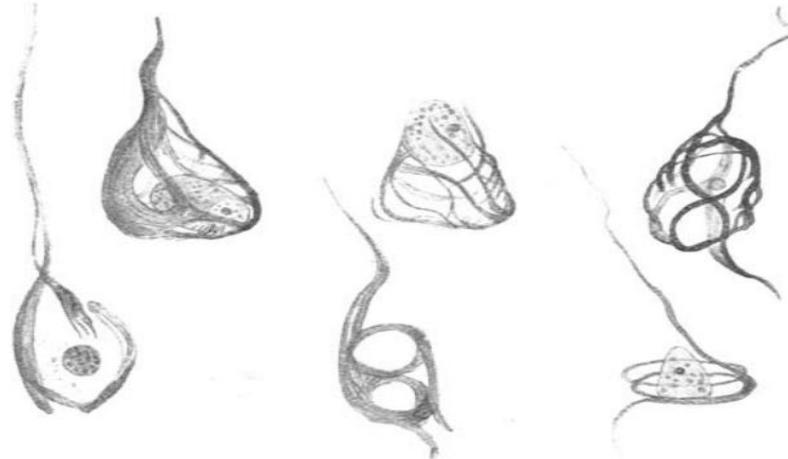


Fig. 8. Eigentümliche Fibrillenveränderung der Ganglienzellen. Fortgeschrittene Erkrankung. Bielschowsky-Präparat.

Figura 1. Ovillos neurofibrilares.

En esta figura se muestran los dibujos realizados por el Dr. Alzheimer en 1911 quien realizó un estudio histopatológico y encontró marañas neurofibrilares situadas en la segunda y tercera capa de la corteza en una porción de cerebro Auguste D. (Alzheimer, 1911).

En la actualidad la EA es considerada un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por muerte neuronal selectiva en regiones específicas del cerebro (Ghoshal et al, 2002) asociadas a la acumulación de formas insolubles de β amiloide en las placas de los espacios extracelulares y la acumulación de proteína tau de los microtúbulos en los ovillos neurofibrilares (Masters et al, 2015).

Estas lesiones patognomónicas de la EA se denominan “patología fibrilar” e incluyen tanto ovillos neurofibrilares como placas neuríticas e hilos neuropilos compuestos principalmente de la proteína asociada a microtúbulos, en una forma filamentosa (Grundke-Iqbal et al., 1986), lo que repercute en el volumen y apariencia del cerebro.

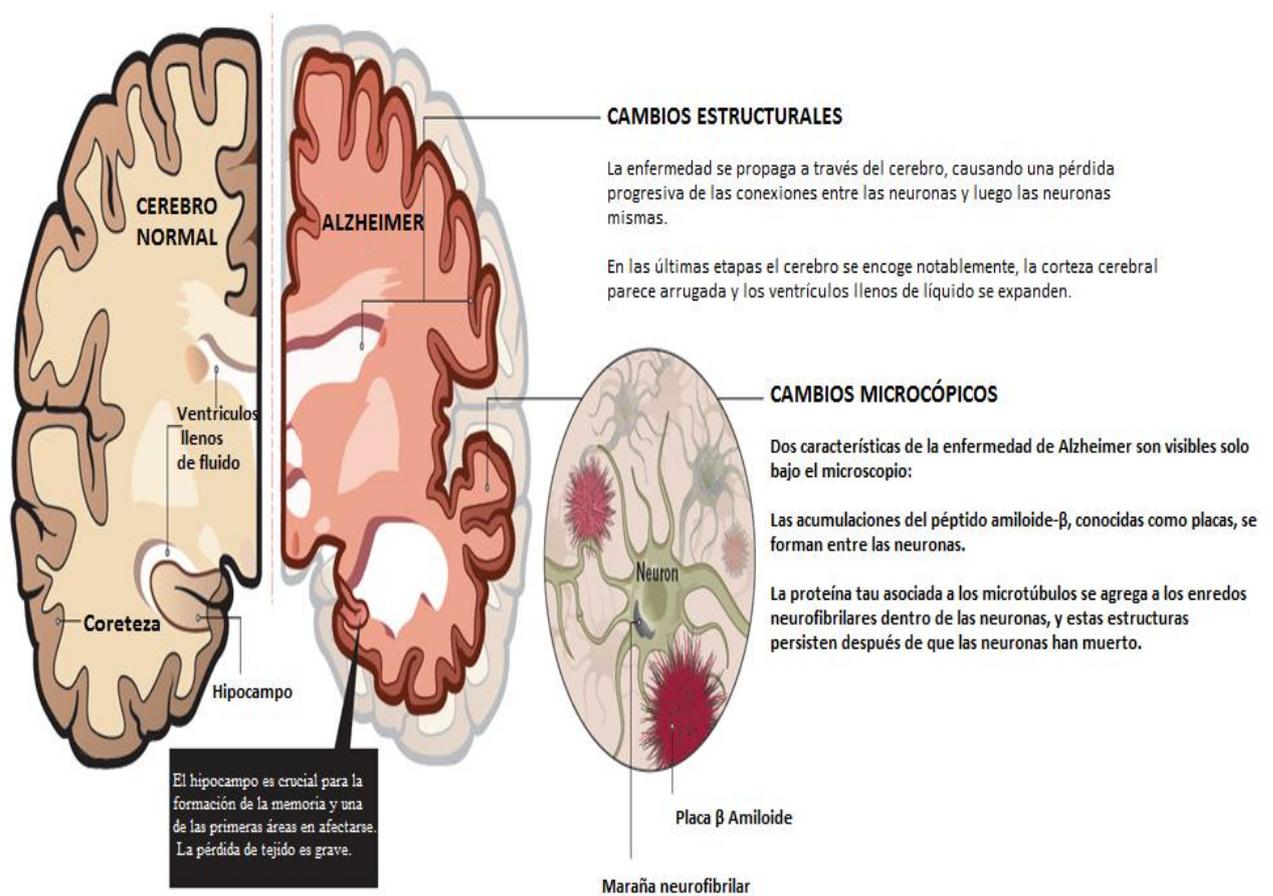


Figura 2. Cambios estructurales y microscópicos en el cerebro de un sujeto con enfermedad de Alzheimer.

Panel A: En la enfermedad de Alzheimer se puede observar atrofia del cerebro, especialmente en la región del hipocampo. Con el progreso de la enfermedad se pierden las conexiones entre las neuronas. En la figura se muestra un esquema representativo de un corte transversal de un cerebro normal y de un cerebro de una persona con Alzheimer. Se muestran los ventrículos en donde reside el líquido cefalorraquídeo y se observa el ventrículo lateral ensanchado en el caso del cerebro con EA a expensas de una disminución del hipocampo. También se muestra un esquema representativo de las marañas neurofibrilares y de las placas amiloideas. Tomada de Drew, L. (2018) An age-old story of dementia. *Nature*, 559 (7715), S2-S3.

Otras características patológicas de la enfermedad incluyen lesiones intracelulares de degeneración granulovacuolar y placas amiloides extracelulares las cuales parecen involucrar regiones cerebrales vulnerables en un patrón predecible, no aleatorio, que comienza en la corteza entorrinal, se propaga al hipocampo y eventualmente afecta a la corteza temporal (Ghoshal et al, 2002).



Figura 3. Progresión de los cambios neurodegenerativos en el cerebro de pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

En esta figura se muestran en color azul las placas y los ovillos, que tienden a propagarse a través de la corteza en un patrón predecible a medida que avanza la enfermedad. La tasa de progresión es variable. Ilustración de Alzheimer's Association. Disponible en: https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers/brain_tour_part_2

Estas alteraciones causan un déficit progresivo en la memoria episódica, que al combinarse con un deterioro en al menos otro dominio cognitivo (funciones ejecutivas, búsqueda de palabras y memoria semántica) y cuando se asocian con un impacto significativo en las actividades instrumentales de la vida diaria (DSM V), permiten hacer un diagnóstico de presunción de EA.

En la clínica, para probar la memoria episódica se utilizan pruebas de recuperación de tres palabras y los elementos de orientación del *mini examen del estado mental*. Este también contiene elementos para la memoria de trabajo (serie 7 y ortografía hacia atrás), nombres de confrontación (pluma y reloj) y habilidades de construcción (pentágonos superpuestos) (Vandenberghe & Tournoy, 2005).

Además, para diagnosticar la EA se ha recurrido a otras técnicas como la resonancia magnética estructural (RM) pues muchos estudios exploran cómo los volúmenes cerebrales regionales se relacionan con varias funciones cognitivas (Braskie & Thompson, 2013). La correlación entre la estructura del cerebro y la cognición son más fáciles de detectar en cohortes que incluyan EA y Deterioro Cognitivo Leve (DCL),

debido a que el proceso de la enfermedad promueve la atrofia cerebral y el deterioro cognitivo (Braskie & Thompson, 2013). El rendimiento de la memoria se correlaciona con las medidas de las estructuras del lóbulo temporal afectadas precozmente en el proceso de la enfermedad, incluyendo el hipocampo y la corteza entorrinal (Braskie & Thompson, 2013). La función ejecutiva y la cognición global suelen mostrar asociaciones significativas con medidas más amplias: atrofia cerebral total, agrandamiento ventricular y grosor cortical en múltiples regiones cerebrales. (Braskie & Thompson, 2013)

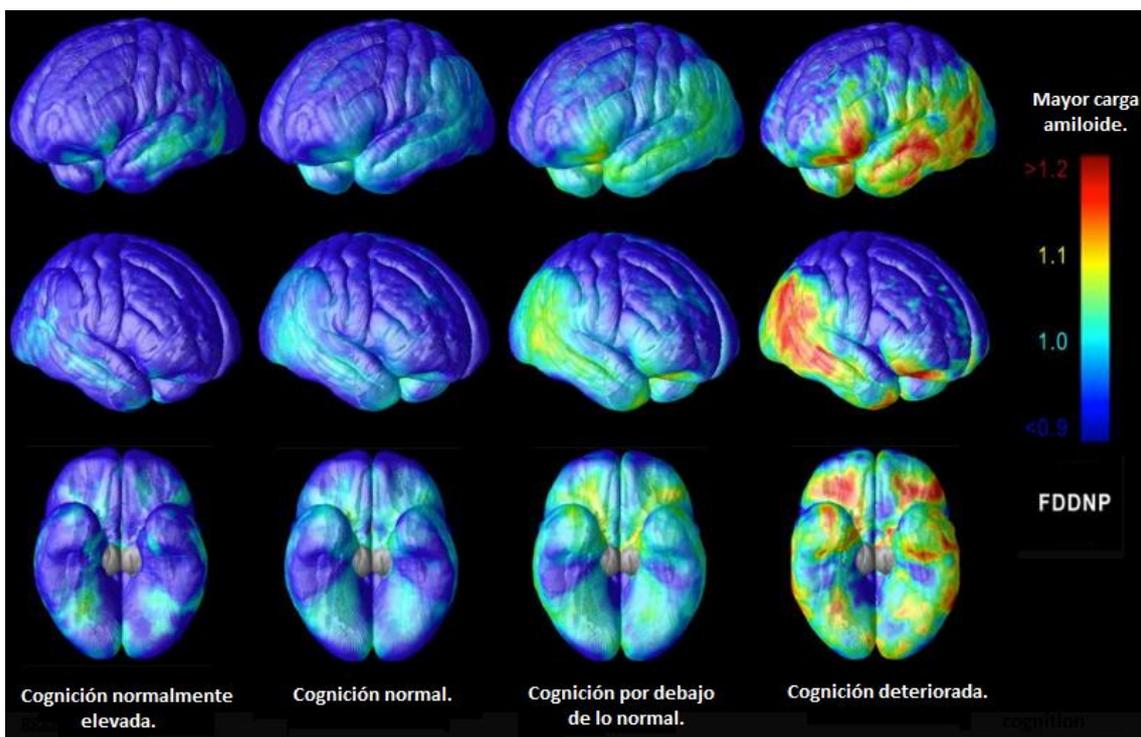


Figura 4. Patología del cerebro en diferentes etapas de deterioro cognitivo.

La imagen muestra datos del cerebro de sujetos con diferentes niveles de rendimiento cognitivo, incluidos pacientes adultos mayores cognitivamente intactos, Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y Alzheimer. La acumulación de 2-(1-{6-[(2-[flúor-18] fluoroetil) (metil) amino]-2-naftil}-etilideno) malonitrilo (FDDNP), es consistente con las deposiciones de placas y ovillos en sujetos vivos. En la parte derecha se observa una escala en donde el color rojo corresponde a una mayor concentración de FDDNP, lo que representa puntuaciones cognitivas más bajas. (Braskie & Thompson, 2010)

Además de los cambios a nivel celular, no podemos dejar de lado la anotación del Dr. Alois Alzheimer en la cual relata que antes de presentar las deficiencias conductuales y de la memoria, Agusté, mostró un fuerte sentimiento de celos hacia su esposo (Maurer, Volk & Gerbaldo, 1997). Esto resulta relevante porque en la actualidad además de haber ratificado los hallazgos histopatológicos de esta enfermedad, ahora se sabe que la personalidad (definida como la variación única que tiene cada individuo para responder

a diferentes clases de estímulos ambientales) también aportar información valiosa sobre la enfermedad.

En este sentido los estudios de Johansson et al (2010 y 2014) sugieren que “la personalidad puede influir en el riesgo individual de demencia a través de su efecto en el comportamiento, estilo de vida o reacciones al estrés” (Johansson et al, 2014). Como ejemplo, en una muestra de 800 mujeres entre 38 a 54 años que participaron en un estudio entre 1968 y 2005, se encontró que el neuroticismo de la mediana edad estaba asociado con un mayor riesgo de demencia tipo Alzheimer, pues durante los 38 años de seguimiento de estas mujeres, 153 desarrollaron demencia, de las cuales 104 se diagnosticaron como demencia de tipo Alzheimer (Johansson et al, 2014).

También en 2010 con el mismo grupo de estudio, los autores llegaron a la conclusión de que la angustia prolongada y el estrés psicosocial están asociados con un mayor riesgo de presentar demencia específicamente de tipo Alzheimer (Johansson et al, 2014).

Ambos resultados tienen implicaciones clínicas ya que se identificaron factores de riesgo que hacen proclives a las personas para desarrollar este tipo de demencia. Por lo tanto, el tomar en cuenta este tipo de información podría permitir identificar población vulnerable y desarrollar intervenciones que coadyuven en la prevención de esta enfermedad (Johansson et al, 2014).

Es importante señalar que la población con demencia va en aumento, pues en 2015 alrededor de 50 millones de personas padecían esta enfermedad, y se espera que para el año 2050 esta población se incremente a 130 millones de personas (Drew, 2018). En promedio, la duración de la enfermedad es de 8 a 10 años, pero es precedida por etapas preclínicas y prodrómicas que generalmente se extienden a lo largo de dos décadas (Masters et al, 2015). Por lo que es sustancial el desarrollo de pruebas biológicas que permitan realizar un diagnóstico anticipado.

Asimismo, cabe investigar si la enfermedad de Alzheimer es una parte inevitable del envejecimiento normal o si se trata de un proceso de enfermedad discreta, pues en la actualidad el diagnóstico de EA, como se mencionó anteriormente se realiza por apreciación clínica y se basa en el DSMV, pero su determinación y manejo se complica por las comorbilidades frecuentes a esta edad como son la enfermedad cerebrovascular

y la esclerosis del hipocampo (Masters et al, 2015). Además, la enfermedad de Alzheimer comparte una característica vista en otras enfermedades neurodegenerativas (Parkinson) y en algunas enfermedades neuropsiquiátricas (Esquizofrenia y trastorno bipolar), la reducción de la capacidad olfatoria.

1.2 El Olfato y el Olvido

En el año de 1984 Richard Doty presentó la primera *prueba estandarizada fácil de administrar para evaluar la función olfativa humana*. (Doty, 1984a). Sus resultados favorecieron una controversia de la fisiología olfatoria la cual suponía una relación entre la edad y la olfacción ya que algunos investigadores reportaban que *había/o no había* influencia del envejecimiento sobre esta función (Doty, 1984a).

En el mismo año se observó en un estudio realizado con 1,955 personas con un rango de edad entre los 5 y los 99 años, que la capacidad promedio para identificar olores es superior entre los 20 y 50 años, presentando una ligera disminución del rendimiento a partir de los 60 años y una disminución ya marcada después de los 70 años de edad. Es importante señalar que en ese estudio se encontró que un gran número de personas mayores presentaron anosmia (Doty et al 1984b), es decir que eran incapaces de percibir olores. La conclusión del estudio fue que con la edad se pierde la capacidad olfatoria.

También en el 2002 se realizó un estudio con 2,491 personas con un rango de edad entre los 53 y los 97 años, en donde se reportó una prevalencia de olfacción alterada del 24%, en tanto que en personas de 80 a 97 años aumentó hasta 62.5 % (Murphy, 2002).

Doty en su estudio describe que las deficiencias olfatorias relacionadas con la edad han causado la pérdida de millones de dólares por daños tanto materiales como a la integridad física de las personas. Cada año se produce un número considerable de explosiones de gas butano y propano que pueden vincularse directamente con la incapacidad de oler o de reconocer los aromas añadidos a estos gases para hacerlos perceptibles, además de que un número desproporcionado de ancian@s muere por accidentes de intoxicación por gas (Doty, 1991).

Broad (2017), basándose en estudios realizados en 2008 por Murphy y por Lafreniere & Mann en 2009, menciona que esta la disminución en la capacidad a de identificación y

de interpretación ambiental correcta de las señales olfativas es una característica común de las personas con avanzada edad. Esto, puede conducir a una disminución en la calidad de vida ya que reduce la conciencia ambiental, y la apreciación de los sabores, lo que podría resultar en reducción del apetito y en un detrimento nutricional (Broad, 2017).

Estudios posteriores relacionaron la disminución en la capacidad olfatoria en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer, que suele presentarse en personas de edad avanzada en las que se ha descrito pérdida de la capacidad olfatoria. Además, en estos pacientes se ha observado daño en las regiones del cerebro involucradas en el procesamiento de la información olfativa, como lo son la corteza entorrinal, la corteza prepiriforme y el núcleo olfatorio anterior (Murphy, 1995).

En 1986 (Koss) había señalado que los deterioros olfativos son evidentes en las primeras etapas de la demencia y que a medida que aumenta, los umbrales de detección también lo hacen, lo que sugiere que el deterioro en la capacidad de detección de olores está asociado al grado de demencia. Por lo tanto, puesto que la identificación del olor requiere más procesamiento cognitivo que la detección del olor, puede argumentarse que la identificación del olor está más influenciada por el estado cognitivo que la agudeza de la detección del olor (Serby et al, 1991 en Murphy, 1995), ya que esta implica la detección, discriminación, reconocimiento y recuperación de una etiqueta o nombre (Chobor, 1992; Murphy, Anderson, & Markison, 1994 en Murphy, 1995).

Cabe señalar que además de la enfermedad de Alzheimer una serie de enfermedades comunes en adultos mayores se han asociado con la disfunción olfativa, estas incluyen depresión, enfermedad priónica, epilepsia, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, trauma físico y diabetes. En algunos casos, el declive olfatorio se ha asociado con el inicio de los síntomas, sugiriendo que las disminuciones olfatorias observadas en pacientes "normales" también pueden contribuir al desarrollo incipiente de enfermedades neurológicas que a menudo se observan en los adultos mayores (Broad, 2017).

Algunos estudios han demostrado que el rendimiento en las pruebas de identificación de olores se correlacionan con las puntuaciones de la *prueba mini-mental state* como (Folstein y Mchugh, 1975) en personas con la enfermedad de Alzheimer. Es decir, a

menor capacidad de identificación de olores, menor puntaje obtenido en la prueba, sugiriendo que la identificación olfativa es un indicador de la capacidad cognitiva (Cain y Gent, 1986, Murphy y Cain, 1986 en Murphy, 1995).

Cabe señalar, que todos los estudios publicados de identificación olfatoria en esta enfermedad se habían basado en el funcionamiento léxico como forma de respuesta. Es por esto que en la investigación de Charlie Morgan (2008), las palabras fueron reemplazadas por imágenes, y los participantes tuvieron la opción de señalar el cuadro que representaba el olor, eliminando así las demandas léxicas. Los resultados obtenidos sugieren que la identificación del olor sigue siendo pobre incluso cuando se eliminan las demandas léxicas.

Wang & Zhou, investigaron la recuperación y la codificación de la memoria episódica en el envejecimiento normal y en los pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) utilizando pruebas neuropsicológicas. No se encontró diferencia en edad, educación y distribución de género entre el grupo de edad normal y el grupo con DCL, pero si algo que denominaron como un "fenómeno interesante", pues hubo un decremento de aproximadamente 6,84% en la recuperación de la memoria episódica en el grupo de personas con DCL, mientras que en la codificación de la misma en el mismo grupo se redujo un 22,8%. Estos resultados indicaron que la codificación de la memoria episódica es vulnerable en pacientes con DCL. La DCL es el estado de transición entre el envejecimiento normal y la enfermedad de Alzheimer, pues un porcentaje mayor de estos pacientes desarrollan la enfermedad de Alzheimer en contraste con la población general de adultos mayores (Wang & Zhou, 2002).

En este sentido, es importante mencionar que la corteza entorrinal es la vía de entrada al hipocampo y la base de la codificación de la memoria episódica (Wang & Zhou, 2002); Además de que la patología neurofibrilar y la pérdida neuronal en esta enfermedad se observa por primera vez en esta estructura y posteriormente se extiende a otras áreas del cerebro.

Algunas investigaciones han descubierto que la pérdida profunda de la capa II de las neuronas de la corteza entorrinal se produce en la enfermedad de Alzheimer leve y un marcado decremento distingue incluso la enfermedad de Alzheimer muy leve, del envejecimiento sin demencia. Estos hallazgos sugieren que este padecimiento no deriva del envejecimiento normal sino que son dos procesos bien diferenciados tanto

desde el punto de vista clínico como patológico. Por lo anterior se puede sospechar que también hay cambios neuropatológicos o pérdida neuronal en la corteza entorrinal en pacientes con Deterioro Cognitivo Leve.

1.3 Neurogénesis

Como ya se ha señalado, la función olfatoria plantea muchos puntos interesantes, uno de ellos versa sobre que la disfunción olfatoria es una señal temprana común en varias enfermedades neurodegenerativas (Arnold et al, 2010). El otro es la capacidad neurogénica del neuroepitelio olfatorio.

La neurogénesis es definida como un proceso de generación, maduración, e integración en los circuitos neuronales de neuronas funcionales a partir de células progenitoras, las cuales tienen la capacidad de proliferar para generar más de sí mismas (Ming y Song, 2005 p.224).

Inicialmente se pensó que las células madre neurales en el sistema nervioso central adulto se formaban exclusivamente antes del nacimiento, (Bordey, 2006). Con los métodos disponibles en la época de Santiago Ramon y Cajal era imposible rastrear el destino de esas células en división y probar que las células recién nacidas eran en realidad neuronas.

Fue hasta finales de la década de 1950, que se logró etiquetar las células en división con [H3] –timidina (que se incorpora en el ADN replicante durante la fase S del ciclo celular y puede ser detectado con autorradiografía) lo que permitió a reportar por primera vez la generación de nuevas neuronas en cerebros de ratones (Smart, 1961) (Altman & Das, 1965).

A partir de las investigaciones de Gratzner en el año de 1982 el campo fue evolucionando, ya que introdujo otro marcador de la fase S del ciclo celular, que es la etapa en que las células replican su ADN para posteriormente dividirse. La bromodeoxiuridina (BrdU) es un análogo sintético de la timidina, uno de los 4 nucleósidos que se unen a la desoxirribosa para formar al DNA. El marcaje con BrdU es la técnica más utilizada para señalar a las células en proliferación. En este sentido se ha logrado observar neurogénesis en la etapa adulta en todos los mamíferos examinados,

incluido el ser humano. Sugiriendo que los precursores neuronales con capaces de dividirse y de incorporarse a la circuitería (Ming y Song, 2005).

Recientemente se demostró que la proteína Ki67 es un marcador de proliferación que también es útil para señalar a las células neurogénicas (Kee et al 2002).

La proteína Ki-67 fue inicialmente descrita por su reconocimiento con un anticuerpo monoclonal (Scholzen & Gerdes 2000). Este se generó inmunizando ratones con núcleos de la línea celular L428 de linfoma de Hodgkin. El nombre se deriva de la ciudad de origen en donde se encontraba en laboratorio donde se preparó el anticuerpo monoclonal (Kiel) y el número del pozo donde se encontraba el clon original en la placa de 96 pocillos (Scholzen & Gerdes, 2000).

La caracterización del anticuerpo Ki-67 reveló un patrón de tinción reactivo en una estructura nuclear presente exclusivamente en las células en proliferación (Scholzen & Gerdes, 2000). Posteriormente, un análisis detallado del ciclo celular mostró que el antígeno estaba presente en los núcleos de las células en el Fases G1, S y G2 del ciclo celular, así como en la mitosis (Scholzen & Gerdes, 2000), pero no en células en reposo o en reposo en la fase G0 (Gerdes et al., 1984).

Desde entonces, Ki-67 (también conocido como MKI67) es considerado por la mayoría de la comunidad científica como el prototipo de marcador de proliferación celular, y en la actualidad es usado ampliamente para la tipificación de múltiples tipos de células cancerosas (Sales & Vagnarelli., 2018).

En particular, recientemente se encontró que la distribución y los niveles de esta proteína son regulados diferencialmente en las diferentes etapas del ciclo celular. En las células i en interfase la proteína Ki-67 está localizada en el núcleo. En G2 se acumula en l el nucléolo y al inicio de la mitosis se reubica en la periferia de los cromosomas donde permanece hasta la formación de nuevo del núcleo en fase G1 después de la segregación del cromosoma (Sales & Vagnarelli., 2018). Después de esto, la proteína Ki-67 se distribuye primero en focos pequeños y luego se une en los nucléolos (Sales & Vagnarelli., 2018).

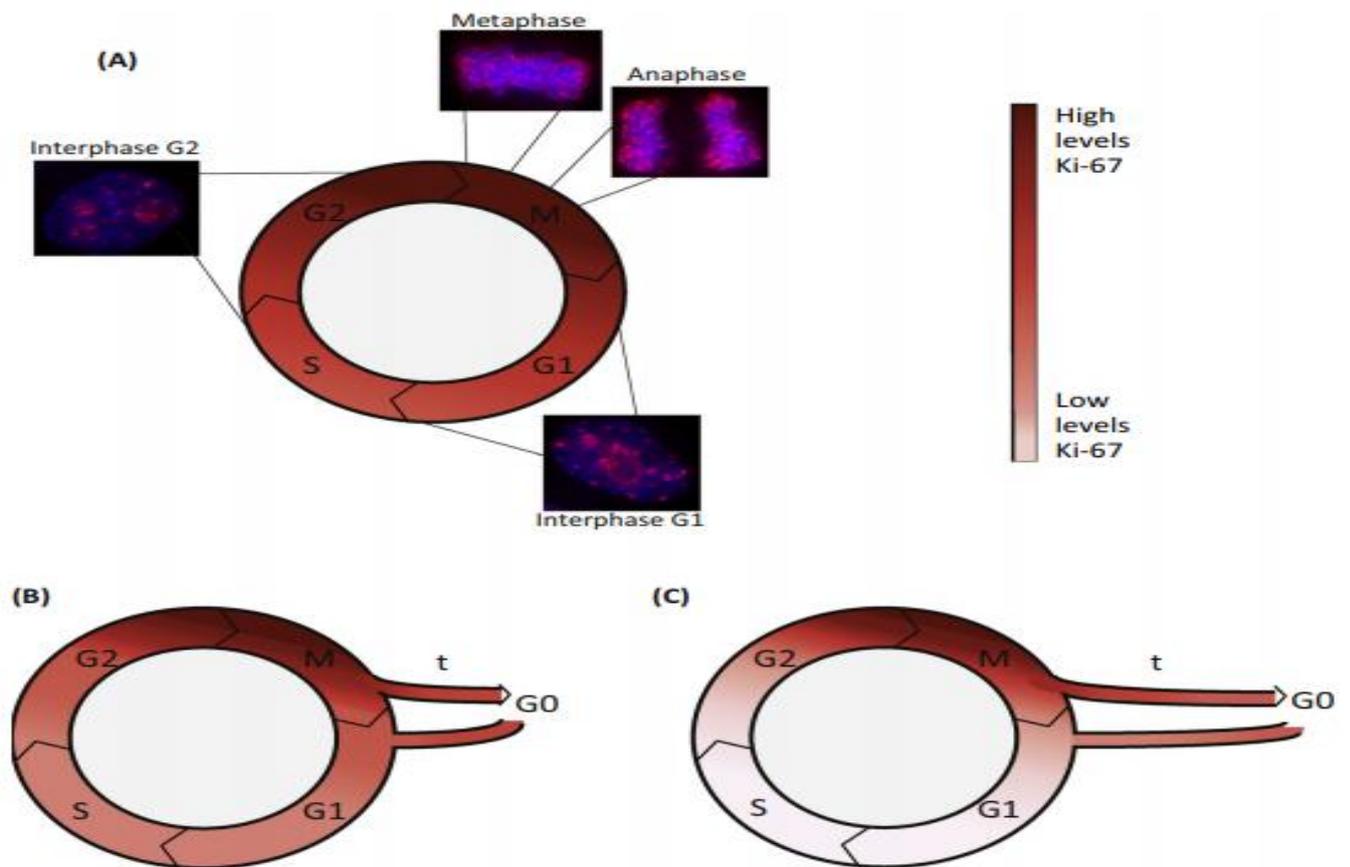


Figura 5. Gradientes de Ki-67 durante el ciclo celular.

Las células en constante división presentan niveles altos de proteína Ki-67 en la fase de transición G2 / M. Los niveles disminuyen gradualmente a medida que la célula progresa a lo largo del ciclo celular. Los niveles más bajos de la proteína Ki se observan en la transición de la fase G1 / S. La localización de Ki-67 también cambia a lo largo del ciclo celular. Las imágenes muestran la tinción de la proteína Ki-67 en las células HeLa en diferentes etapas del ciclo celular. Ki-67 se observa en rojo, los núcleos en azul (B y C). En quiescencia, los niveles de Ki-67 también disminuyen gradualmente. Cuando las células vuelven a entrar en el ciclo celular, los niveles de la proteína Ki-67 disminuyen en función del tiempo en que permanecen en quiescencia. En consecuencia, al entrar al ciclo celular, una célula que pasó un corto tiempo en inactividad (G0) (B) tendrá niveles más altos de Ki-67 en relación a una célula que pasó mucho tiempo en G0 (C). El grado de intensidad del rojo representa los niveles de Ki-67. La escala de color se muestra a la derecha del esquema. Abreviatura: t, el tiempo que una célula pasa en inactividad.

Tomada de Sales Gil R, Vagnarelli P. (2018) Ki-67: More hidden behind a “Classic proliferation marker” Trends Biochem Sci. 2018 Oct; 43(10):747-748. Doi: 10.1016/j.tibs.2018.08.004.

Además de los marcadores BdrU y proteína Ki-67 utilizados para el estudio de la formación de nuevas neuronas, también se ha demostrado que este proceso es un evento dinámico, que está modulado y regulado por diversos factores para responder a las demandas del cerebro. Entre los factores involucrados en la modulación y regulación de este evento se encuentran el nicho y los factores internos y externos, que pueden ser neurotransmisores, factores de crecimiento, factores neurotróficos, hormonas, la actividad física y el aprendizaje (Lledo, Alonso & Grubb, 2006).

Aunado a esto, se ha demostrado que la neurogénesis está asociada a múltiples factores entre los que destaca el aprendizaje y la memoria. Como ejemplo, en 2001 Shors *et al* bloquearon la neurogénesis en las ratas administrando metilazoximetanol una sustancia tóxica para las células en proliferación. Esto disminuyó la neurogénesis hipocampal en un 80% aproximadamente, impidiendo su condicionamiento conductual, ya que el aprendizaje de este tipo de estímulos implica el recuerdo y requieren del funcionamiento del hipocampo. Además, se ha demostrado que, en el cerebro adulto, la neurogénesis persiste a lo largo de toda la vida en condiciones normales. Las principales regiones del cerebro en donde se ha, demostrado este proceso (son: la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular en el giro dentado del hipocampo entre otras. Es importante señalar que la neurogénesis también se lleva a cabo en el neuroepitelio olfatorio que algunos autores consideran como parte del Sistema Nervioso Periférico y para otros autores es la parte más periférica del Sistema Nervioso Central.

1.4 El neuroepitelio olfatorio

La formación y maduración de nuevas neuronas ocurre en el neuroepitelio olfatorio humano a lo largo de toda la vida para reponer a las que mueren y mantener el número de neuronas olfatorias sensoriales, así como la función olfatoria (Farbman., 1994). (Calof & Chikaraishi., 1989) pues los progenitores neuronales del epitelio olfatorio que están en estrecha proximidad física con los ORN pueden "leer" el número de neuronas diferenciadas en su entorno y regular la producción de nuevas neuronas.

Cabe señalar que una tasa normal de eliminación de nuevas neuronas en el NEO es esencial para la exploración y la discriminación óptima de los odorantes (Othman et al, 2005).

Por esto, el neuroepitelio olfatorio se ha propuesto como un modelo subrogado para estudiar alteraciones en la diferenciación y proliferación neuronal en algunas enfermedades psiquiátricas cuya etiología se ha relacionado con el neurodesarrollo. Este

epitelio está formado por células epiteliales sustentaculares, así como por células madre precursoras y basales que proliferan continuamente para amplificar la población precursora neural, induciendo de esta forma la generación de neuronas inmaduras y sensoriales olfatorias (Calof & Chikaraishi., 1989) Este tejido se localiza en la cavidad nasal en el septum nasal y el cornete medio (Leopold et al, 2000). El área de este tejido mide entre 0.5 a 2 cm² que es aproximadamente 3% de la superficie total del epitelio de la cavidad nasal (Sorokin, 1988) (Leopold et al, 2000) y se distribuye en parches en diferentes zonas del epitelio respiratorio.

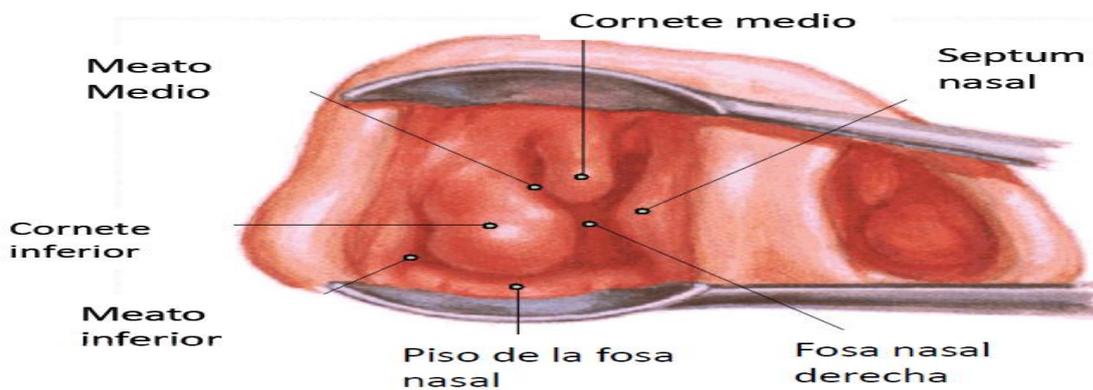


Figura 6. Localización del neuroepitelio olfatorio.

En la figura se muestra un esquema representativo de la anatomía de la fosa nasal. El neuroepitelio olfatorio es un tejido que se localiza cerca de la región más superior de la cavidad nasal entre el septum nasal y el cornete medio.

Obtenido y modificado de: <http://centrootorrinodf.com.br/imgs/rinoscopia.jpg>

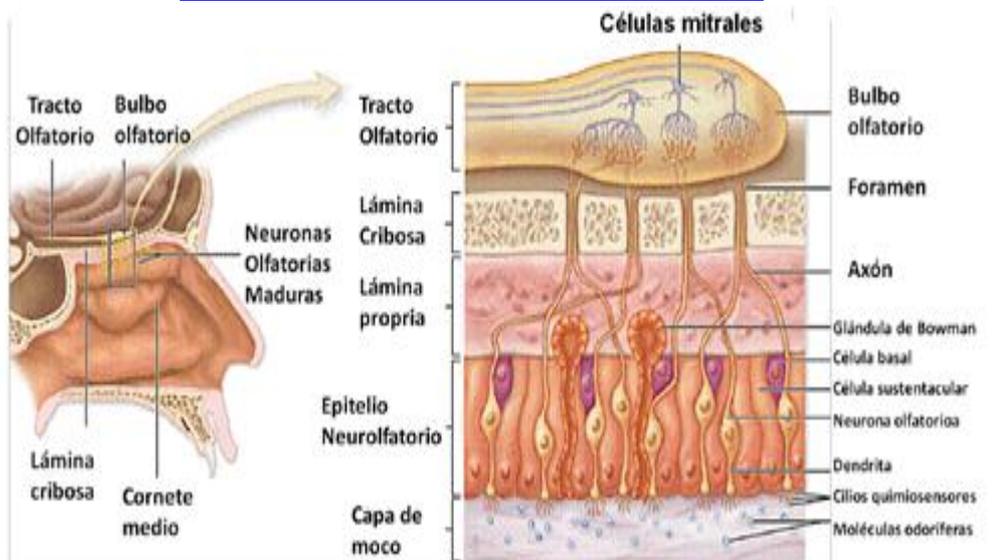


Figura 7. Esquema del neuroepitelio olfatorio y su relación anatómica con el bulbo olfatorio.

En esta imagen se puede observar la composición, organización y localización del neuroepitelio olfatorio. La moléculas odoríferas del ambiente son percibidas por los cilios quimiosensores. Los axones de las neuronas olfatorias se extienden hasta llegar al bulbo olfatorio en donde hacen sinapsis con las células mitrales. Obtenido y modificado de: Mesher AL; Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition: <http://www.accessmedicine.com> Copyright ©The McGraw-Hill companies, Inc. All rights reserved.

Al envejecer los inhibidores de la neurogénesis aumentan (Drapeau & Abrous, 2008), lo que supone que la tasa de proliferación del epitelio olfatorio también lo hace y por ende la capacidad olfatoria.

Se piensa durante esta etapa de la vida adulta las células madre neurales pierden su potencial proliferativo y se vuelven inactivas, pero actualmente se presume que este proceso puede reactivarse con ciertos estimulantes como el ejercicio, la restricción calórica, o con algún otro tipo de sustancia como el resveratrol.

Esta molécula vinculada a la activación de sirtuinas y a la longevidad, al suministrarse en ratones de seis meses de mostro tener resultados positivos en la mejora de la neurogénesis hipocampal, la plasticidad cerebral y la cognición, lo que indica que la plasticidad del SNC se conserva en cierta medida en un organismo envejecido (Katsimpardi and Lledo., 2018).

2. Justificación

En la enfermedad de Alzheimer se sabe que existe un déficit olfatorio en las primeras etapas de su desarrollo, así como una disminución en la cognición y alteraciones histopatológicas en la corteza entorrineal que es la vía de entrada al hipocampo. Además, se produce una disminución en el volumen de esta estructura del cerebro en donde existe un nicho neurogénico, el giro dentado y en donde se integran las funciones cognitivas.

Como se argumentó anteriormente, existe una relación entre la neurogénesis y la capacidad de identificar olores. Además, se ha sugerido que esta aptitud está relacionada con la capacidad cognitiva y que la cercanía anatómica entre las estructuras involucradas en el proceso de olfacción y en la cognición, suponen que una alteración en alguna de estas estructuras repercutiría en la otra.

Conociendo que en el epitelio neuroepitelio olfatorio es una zona neurogénica de fácil acceso, es posible obtener precursores neuronales para estudiarlos *ex vivo* y *utilizarlos como un modelo subrogado del sistema nervioso central ya que* los precursores neuronales del epitelio olfatorio mantienen en cultivo la expresión de receptores a

neurotransmisores, así como las características bioquímicas y metabólicas de las neuronas del sistema nervioso central.

3. Preguntas de investigación

1. ¿La disminución en la formación de nuevas neuronas (neurogénesis) en los precursores neuronales olfatorios está asociada a la disminución del volumen del hipocampo observado en un grupo de pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer?
2. ¿Los adultos mayores (AM) sin enfermedades neurodegenerativas y un grupo de adultos jóvenes (AJ) sin antecedentes neuropsiquiátricos tendrán una tasa similar de proliferación de los precursores neuronales olfatorios?
3. ¿La tasa de proliferación de los precursores neuronales olfatorios determinada *ex vivo* se correlaciona con la capacidad cognitiva determinada con el “*minimal*”?

4. Hipótesis

La tasa de proliferación de los pacientes con AZ es menor que en los adultos mayores y se correlaciona con una disminución en capacidad cognitiva y la disminución en el volumen del hipocampo. La tasa de proliferación de los precursores neuronales olfatorios se correlaciona con la edad del sujeto.

5. Objetivos

Objetivo general: Determinar la tasa de proliferación de los precursores neuronales obtenidos de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer y en adultos mayores y jóvenes sin antecedentes psiquiátricos. **Objetivos específicos:**

- 1) Aislar, cultivar y preservar las células del NEO obtenidas de pacientes con Alzheimer, y de sujetos adultos jóvenes, y adultos mayores.
- 2) Evaluar la viabilidad de las células aisladas del NEO.
- 3) Determinar del índice de proliferación expresado como el porcentaje de células teñidas con el anticuerpo anti ki67 que es un marcador de proliferación celular.

6. Materiales y métodos

6.1 Población de estudio

En este estudio se utilizaron los precursores neuronales mantenidos en criopreservación previamente obtenidos por exfoliación de la cavidad nasal de participantes con diagnóstico de Alzheimer. Estos se reclutaron en la clínica de psicogeriatría del Instituto Nacional De Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz de acuerdo a los criterios del DSM IV (1995). Se solicitaron los expedientes de estos pacientes para extraer datos sociodemográficos, así como estudios relevantes, entre ellos la resonancia magnética y el test *minimal state examination*. Los pacientes que ingresaron al estudio fueron comparados y pareados por edad y sexo, con participantes adultos mayores sanos a los que previamente se les obtuvo una muestra de NEO por exfoliación cuyas células fueron propagadas y criopreservadas en nitrógeno líquido.

Los controles adultos jóvenes fueron reclutados para la obtención de precursores neuronales olfatorios a través de exfoliación nasal. Las células se propagaron y se mantuvieron en crio preservación. A los adultos jóvenes se les aplicó el test *minimal state examination*.

6.1.1 Criterios de Inclusión:

Se incluyeron 2 pacientes en este estudio (1 femenino y otro masculino),

A todos los participantes (pacientes y controles) se les solicitó que leyeran, entendieran y firmaran el consentimiento informado.

Criterios de Exclusión:

Se excluyeron a los pacientes con presencia al momento de la selección de un cuadro clínico infeccioso de vías aéreas superiores, antecedentes de rinitis alérgica, o bajo tratamiento con anticoagulantes.

6.1.2 Tamaño de Muestra:

Se eligieron 4 sujetos sanos y 2 sujetos de estudio, pareados por edad y sexo.

6.2 Obtención de la muestra

La exfoliación nasal se hizo de acuerdo con el método descrito por Benítez-King et al en 2011. Se realizó un aseo nasal previo a la toma de muestra. Mediante visualización directa iluminada, se hizo un raspado nasal con cepillo de citología en la región lateral de la cabeza del cornete medio y la porción de *septum* nasal que se encuentra en oposición a la misma. Las células adheridas al cepillo se desprendieron con agitación vigorosa en medio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM-F12). Posteriormente, se desprendieron del cepillo por agitación mecánica y se sembraron en una caja de 24 pozos de tal superficie en cm². El medio de cultivo utilizado en esta etapa fue DMEM-F12 (*Dulbecco's modified Eagle Medium/Nutrient Mixtures F12*) suplementado con suero fetal bovino al 10% (ambos de Gibco, Gran Island, New York), L-Glutamina 2% y los antibióticos de Estreptomina 100 µg/mL y Penicilina 100 µg/mL al 2% mencionar temperatura y atmósfera de CO₂ 5% aire 95%.

6.2.1. Cultivo celular

Las células se incubaron durante 4 días que fue el tiempo en el que los precursores neuronales alcanzaron una confluencia del 98%. Estas se desprendieron del sustrato con EDTA en una concentración de 0.03% durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó una solución de tripsina al 0.25% y las células se incubaron por otros 5 minutos. Las células suspendidas se resembraron en una botella de 25 cm² a una densidad de tantas células por pozo o por cm². Una vez que alcanzaron una confluencia del 98% nuevamente se desprendieron por el método antes descrito y se volvieron a sembrar en botellas de 25 cm², hasta alcanzar el pasaje 4 (el número de veces que desprendimos las células y que volvieron a sembrarse).

6.2.2. Sembrado celular para experimentación

Una vez alcanzado el pasaje 3, se sembraron 10,000 precursores neuronales sobre un cubreobjetos de 1 cm², en cajas de 4 pozos.

Estas células, se mantuvieron en medio DMEM-F12 suplementado durante 4 días. Todos los experimentos se realizaron en células cultivadas entre el pasaje 4 y 7.

6.2.3. Inmunofluorescencia de doble marcaje.

Los precursores neuronales se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron de forma exhaustiva con PBS. Posteriormente las células se bloquearon con Glicina 0.3 M en PBS durante 10 min y se permeabilizaron por otros 10 minutos con *Tritón X-100* 0.2% en PBS.

Después, se realizó bloqueo de los sitios no específicos con una solución de bloqueo con BSA al 1% con *Tween 20* 0.05% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para detectar la presencia de Ki-67 las células se incubaron con un primer anticuerpo policlonal anti-Ki67 hecho en conejo (ABCAM) a una dilución 1:200 durante toda la noche a una temperatura de 4°C en cámara húmeda. Utilizamos como segundo anticuerpo (FITC anti-conejo) en una dilución de 1:50 y los cubreobjetos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Los microfilamentos se tiñeron con faloidina rodaminada 800 nM durante 45 min a temperatura ambiente. Mientras que los núcleos se tiñeron con 4',6'-diamidino -2-fenilindol (DAPI) por 10 min.

Los cubreobjetos se montaron con PVA DABCO para fluorescencia en portaobjetos de vidrio. Las imágenes se observaron con un microscopio Nikon de epifluorescencia equipado con una cámara Digital Sight Nikon OS-2Mu y Nikon OS Ri10 para posteriormente ser procesadas con el software NIS-Elements de Nikon versión 2.3.

Morfometría

La cantidad de células teñidas con el anticuerpo anti-Ki67 se determinó en 5 campos semiconfluentes por cubreobjetos. En total se realizaron conteos celulares en 15 diferentes campos, elegidos de forma aleatoria. También se determinó el número de células por campo mediante la tinción de los núcleos teñidos con DAPI.

7. Resultados

7.1 Del ingreso al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Se solicitaron los expedientes de los pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer en la clínica de psicogeriatría del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz y se extrajo información que se consideró relevante para este estudio que se realizó en dos sujetos, uno de sexo femenino y otro de sexo masculino. En la tabla I se muestran los datos sociodemográficos de los dos pacientes estudiados.

Tabla I. Datos sociodemográficos.

SUJETOS	OCUPACION ACTUAL	ESCOLARIDAD	ESTADO CIVIL	TABACO	ALCOHOL	MEDICAMENTOS TOMADOS EN EL PERIODO DE LA TOMA DE MUESTRA
AZ FEMENINO 53 años	Ama de casa	Preparatoria	Divorciada. (Estuvo casada 24 años)	No	No	CITALOPRAM DISPERIDONA BIPERIDENO
AZ MASCULINO 67 años	Actualmente sin ocupación.	Licenciatura	Casado	No	No	LEVOTIROXINA TIMOLOL OFTALMICO, LATANAPROST OFTALMICO. CITALOPRAM VALPROATO

En la tabla II se describen los motivos que llevaron a solicitar atención médica dentro del INPRFM, en donde resaltan evaluaciones previas de otras instituciones que señalan algún tipo de deterioro.

Tabla II. Ingreso al I Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

SUJETOS	MOTIVO DE INGRESO
<p>AZ FEMENINO 53 años</p>	<p>"Del médico la mandaron con el psicólogo y con el neurólogo y de ahí para acá".</p> <p>En neurología observaron reducción bilateral de hemisferios. Después de la muerte de su madre exacerbación de los spintomas. Lenguaje incongruente, risas inmotivadas, soliloquio, presencia de asociación libre, insomnio inicial de 3-5hrs. Platica frente al espejo, no permanece quieta mas de una hora, aplaude mueve las manos constantemente.</p>
<p>AZ MASCULINO 67 años</p>	<p>"Mi esposa me hacía ver casi lo inmediato, cosas triviales, no los retenía". Identifica inicio del padecimiento actual desde hace un año y medio. Ánimo bajo la mayor parte del tiempo, fatiga, anhedonia, disminución de la atención y la concentración, ideas de minusvalía, culpa, desesperanza. Desde hace 2 años familiares notan olvidos frecuentes sobretodo recuerdos inmediatos, repetición de palabras en una conversación. Acudió a Hospital General donde se realizaron pruebas WAIS, BENDER, MACHOVER, ROSCHARCH, MMPI, los cuales reportan índice de deterioror del 22%, difícil estructuración de conceptos verbales, razona,miento eritmético y concentración, pobre juicio social, ejecución ojo mano lenta, difícil planeación y ejecución.</p>

En ambos pacientes no se reportaron antecedentes psiquiátricos familiares de relevancia:

Tabla III. Antecedentes.

SUJETOS	ANTECEDENTES PSIQUIATRICOS FAMILIARES.	OTROS ANTECEDENTES.
<p>AZ FEMENINO 53 años</p>	<p>No</p>	<p>Padres divorciados.</p>
<p>AZ MASCULINO 67 años</p>	<p>Catalogados como sin relevancia. Tía paterna: deterioro cognitivo no especificado. Finada. Padre: deterioro cognitivo no especificado. Finado.</p>	<p>Madre: Diabetes tipo II e hipertensión arterial. Esposa refiere " Esta cuestión de los ólvidos no es nueva, en la primaria era catalogado como niño "burro". Sus notas fueron siempre malas y siempre ha sido malo para orientarse por ejemplo en carreteras y calles"</p>

7.2 De las evaluaciones realizadas dentro del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

En la primera columna de la tabla IV se describe la evaluación que se realizó a los pacientes al ingresar al INPRFM. Mientras que en la segunda se describen los síntomas que presentaban en el periodo en que se realizó el exfoliado nasal para la obtención de precursores neuronales.

Tabla IV. Evaluaciones.

SUJETOS	EVALUACIÓN DE INGRESO	EVALUACIÓN MAS CERCANA A LA TOMA DE MUESTRA
AZ FEMENINO 53 años	Paciente alerta consciente orientada en tiempo y lugar y parcialmente en circunstancia. Habla pausado , ánimo "Estoy muy bien". Pensamiento sin alteraciones en forma y contenido. Memoria reciente, mediata y remota disminuidas, semántica y procedural disminuidas. Abstracción y síntesis disminuidas.	Refiere verborrea , disminución del apetito, despertares (2 mayoría en la noche) con risas inmotivadas durante los mismos (carcajadas). Mal orientada, memorias disminuidas, FMS disminuidas. Animo "muy bien" afecto con tendencia a la hipertimia. Nula consciencia de la enfermedad.
AZ MASCULINO 67 años	Consciente, orientado cooperador, higiene y aliño adecuados. Animo referido como "bien" afecto hipotímico. Lenguaje coherente y congruente. Tono velocidad y volumen normales. Discurso fluido espontaneo coherente, congruente. FMS: atención normal, concentración disminuida, cálculo normal, memoria reciente disminuida, síntesis abstracción , praxias y gnosias adecuadas, juicio conservado.	Esposa describe estabilidad conductual anímica y cognitiva. Funcionalmente estacionado en control de comorbilidades, sueño inducido, adecuada alimentación. Resalta marcada alteración del lenguaje que imposibilita comunicación afectiva, no impresiona elementos psicóticos en el contenido del pensamiento o la sesnsopercepcion , controla impulsos, limitada introspección.

7.3 Resultados de los test Minimental de los pacientes

El test *minimntal state examination* fue desarrollado por Marshal F. Folstein, Susan Folstein, y Paul R. McHugh en 1975 como un método para establecer el estado cognoscitivo del paciente tomando en cuenta 5 dimensiones: Orientación, memoria inmediata, atención y cálculo, lenguaje y praxis constructiva (tareas de ensamblajes bidimensionales o tridimensionales y de producción y copia de dibujos). Puntúa como máximo un total de 30 puntos.

En la tabla IV se muestra que los participantes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer tienen un decremento de 27% (F) y 17%(M), respectivamente en la prueba cognitiva en contraste con los sujetos control cuyo puntaje es alrededor del 100% (30 puntos) (Folstein et al, 1975)

Tabla IV. MiniMental.

SUJETOS	PUNTAJE MINIMENTAL
AZ FEMENINO 53 años	22 PTOS.
AZ MASCULINO 67 años	25 PTOS.

7.3.1 Interpretación del resultado atendiendo a la edad y el nivel de estudios.

A continuación, se muestra una tabla (V) en la que se relaciona la puntuación mínima que debería obtener un sujeto en función del nivel de su edad y nivel de estudios.

Edad en años	18-24	25/9	30/4	35/9	40/4	45/9	50/4	55/9	60/4	65/9	70/4	75/9	80/4	>84
Estudios Elementales	22	25	25	23	23	23	23	22	23	22	22	21	20	19
Estudios Primarios	27	27	26	26	27	26	27	26	26	26	25	25	25	23
Estudios Medios	29	29	29	28	28	28	28	28	28	28	27	27	25	26
Estudios Superiores	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	28	28	27

Figura 8. Interpretación de resultados en función de edad y nivel educativo.

En esta imagen se ubican los resultados obtenidos por los pacientes en función de su edad y nivel educativo. — AZ masculino — AZ femenino.

La tabla fue recuperada de : <http://www.generalasde.com/mini-examen-cognoscitivo/mini-examen-cognoscitivo-manual.pdf> y corresponde a una traducción contenida en: R.M. Crm, J.C. Anthony, S.S. Bassett and M.F. Folsterin. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. Journal of the American Medical Association 1993;269(18):2386-239.

En este caso la paciente de 53 años (línea rosa) tiene una escolaridad media, mientras que el paciente de 67 años (línea azul) tiene escolaridad superior, por lo que en ambos casos se encuentran por debajo del puntaje esperado.

Al comparar los puntajes del paciente masculino con AZ con los puntajes obtenidos por el adulto mayor y el adulto joven observamos que estos dos último son mayores que el paciente AZ, y que el puntaje máximo fue alcanzó únicamente por el adulto joven.

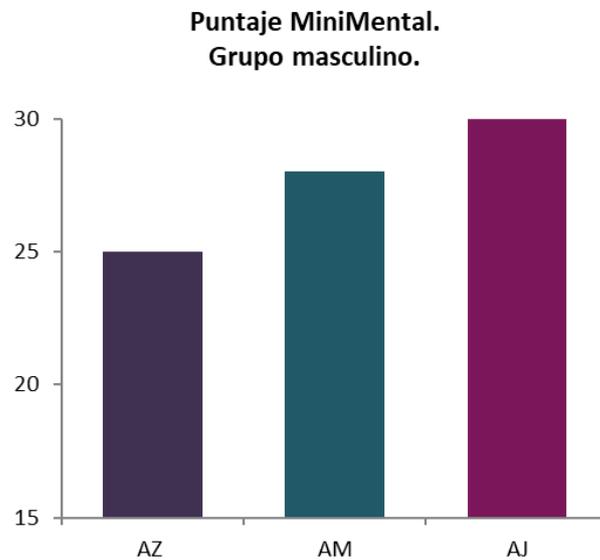


Figura 9. MiniMental grupo masculino.

En la imagen se observan los resultados obtenidos en la prueba MiniMental por cada uno de los sujetos que integran el grupo masculino.

En el grupo femenino no fue posible conocer el puntaje de la adulta mayor, ya que no se encontró esta información dentro de los archivos. Aun así, podemos observar que nuevamente en este grupo el puntaje máximo fue alcanzado por el adulto joven.

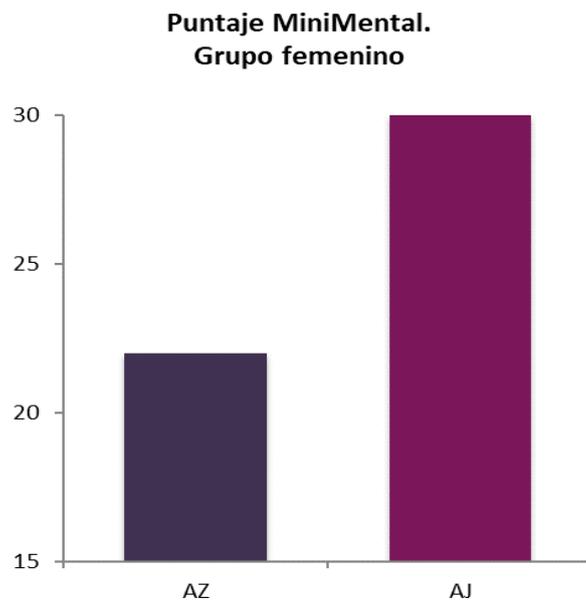


Figura 10. MiniMental grupo femenino.

En la imagen se observan los resultados obtenidos en la prueba MiniMental por cada uno de los sujetos que integran el grupo femenino.

Los resultados de los pacientes se obtuvieron al solicitar los expedientes al departamento de Psicogeriatría del INPRFM.

Posteriormente fueron pareados por edad y sexo, con participantes adultos mayores sanos y con adultos jóvenes, a los que se aplicó el test *minimal state examination* en el laboratorio de Neurofarmacología el día que se obtuvo la muestra del NEO por exfoliado nasal.

7.4 Resultados de las resonancias magnéticas de los pacientes.

En tabla V se muestra la interpretación médica elaborada a partir de las resonancias magnéticas de las pacientes realizadas en el departamento de Imágenes Cerebrales del INPRFM.

Tabla V. Resonancias magnéticas.

SUJETOS	INTERPRETACIÓN DE RESONANCIA MAGNÉTICA DE ENCEFALO
AZ FEMENINO 53 años	Disminución de volumen cortical y subcortical supratentorial. Disminución de volumen de ambos hipocampos con predominio del lado izquierdo. Los hallazgos anteriores sugieren descartar origen fronto-temporal.
AZ MASCULINO 67 años	El sistema ventricular infra y supratentorial se encuentra conservado apreciándose discreta asimetría de los ventrículos laterales izquierdos correlacionado por pérdida de substancia subcortical. Estudio con datos de atrofia cortico subcortical leve, no se observan datos de lesión vascular .

En este caso podemos observar que las disminuciones de volumen entre ambos pacientes difieren, y que la disminución en el volumen del hipocampo de la paciente femenina es mayor.

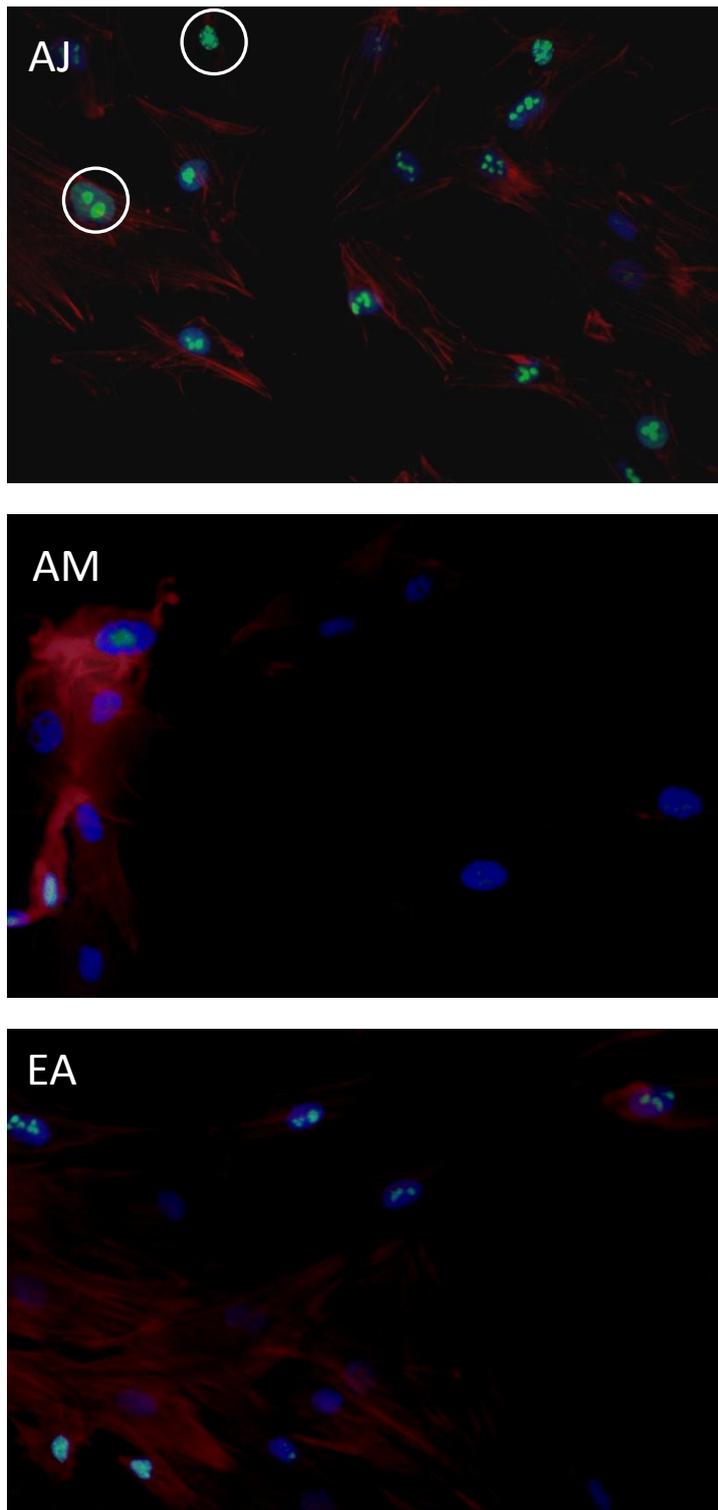


Figura 11. Determinación de la tasa de proliferación de los precursores neuronales obtenidos de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer y en adultos mayores y adultos jóvenes sin antecedentes psiquiátricos.

Imagen representativa de las tinciones correspondientes al grupo femenino.

Los precursores neuronales olfativos sembraron sobre cubreobjetos de 1 cm². Después de mantenerse en medio DMEM-F12 suplementado con suero durante 4 días, las células se fijaron. Para detectar la presencia de Ki-67 las células se incubaron con un primer anticuerpo policlonal anti-Ki67 hecho en conejo (ABCAM). Utilizamos como segundo anticuerpo (FITC anti-conejo). Los microfilamentos se tiñeron con faloidina rodaminada, mientras que los núcleos se tiñeron con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

La cantidad de células teñidas con el anticuerpo anti-Ki67 se determinó en 5 campos semiconfluentes por cubreobjetos. Se determinó el número de células por campo mediante la tinción de los núcleos teñidos con DAPI.

La primera imagen adquirida corresponde al sujeto adulto joven (AJ), observamos un mayor número de células Ki-67 positivas en relación al número total de células teñidas con DAPI. En la misma imagen observamos diferentes distribuciones de la proteína Ki-67. En el adulto mayor (AM) podemos observar que hay un menor número de células KI-67 positivas, además de que la intensidad de la fluorescencia parece ser menor al igual que cantidad de proteína.

En la paciente con enfermedad de Alzheimer (AZ) observamos pocas células Ki-67 positivas en relación al número total, observamos células con diferentes distribuciones de la proteína Ki-67. Y poca intensidad en relación al adulto joven (AJ). Amplificación 1000X.

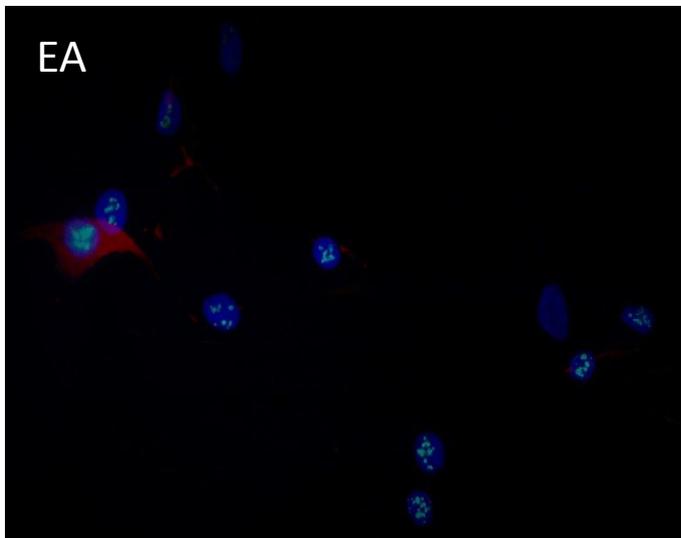
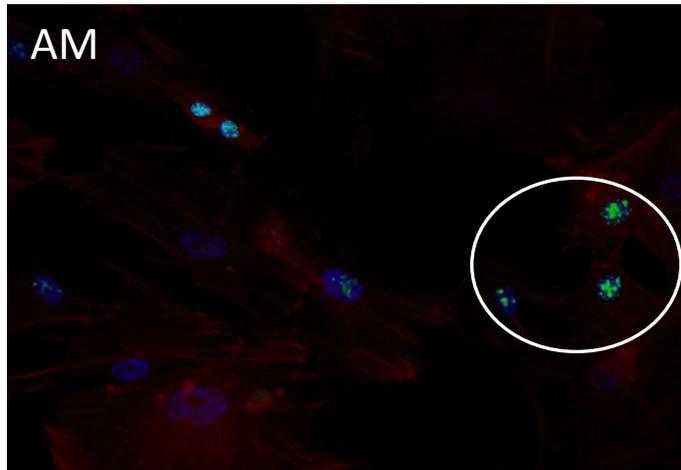
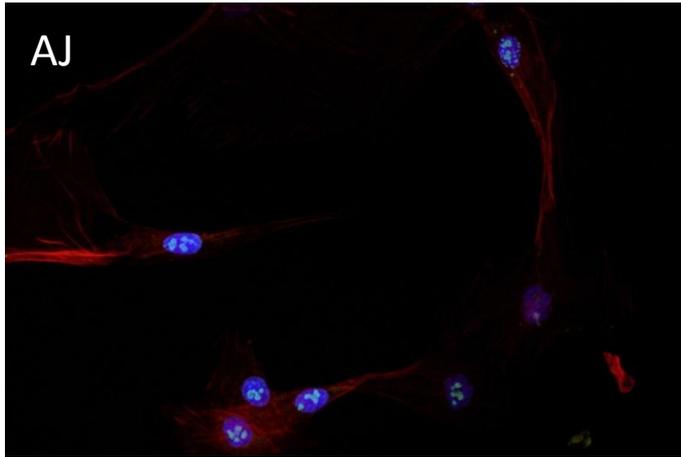


Figura 12. Determinación de la tasa de proliferación de los precursores neuronales obtenidos de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer y en adultos mayores y adultos jóvenes sin antecedentes psiquiátricos.

Imagen representativa de las tinciones correspondientes al grupo masculino.

Los precursores neuronales olfativos sembraron sobre cubreobjetos de 1 cm². Después de mantenerse en medio DMEM-F12 suplementado con suero durante 4 días, las células se fijaron. Para detectar la presencia de Ki-67 las células se incubaron con un primer anticuerpo policlonal anti-Ki67 hecho en conejo (ABCAM). Utilizamos como segundo anticuerpo (FITC anti-conejo).

Los microfilamentos se tiñeron con faloidina rodaminada, mientras que los núcleos se tiñeron con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). La cantidad de células teñidas con el anticuerpo anti-Ki67 se determinó en 5 campos semiconfluentes por cubreobjetos.

Se determinó el número de células por campo mediante la tinción de los núcleos teñidos con DAPI.

La primera imagen adquirida corresponde al sujeto adulto joven (AJ), observamos un mayor número de células Ki-67 positivas en relación al número total de células teñidas con DAPI. En el adulto mayor (AM) podemos observar que hay un menor número de células KI-67 positivas, además de que la intensidad de la fluorescencia en algunas células parece ser incluso mayor que en el adulto joven (AJ).

En la paciente con enfermedad de Alzheimer (AZ) observamos un mayor porcentaje de células Ki-67 positivas en relación al adulto mayor (AM). La intensidad de la fluorescencia parece similar a la del (AJ). Amplificación 1000X.

8. Determinación del número de núcleos teñidos con DAPI en los cultivos, de pacientes y sus controles.

La proliferación de los precursores neuronales obtenidos de a la cavidad nasal de los participantes se determinó *ex vivo* marcando las células con un colorante nuclear (DAPI) que emite fluorescencia azul. Esta técnica de tinción es especialmente útil para el recuento celular. En la tabla VI se muestran las edades de los participantes femeninos y masculinos.

Tabla VI. Pacientes AZ y sus controles.

Grupo Femenino		Grupo Masculino	
AZ	Femenino de 53 años	AZ	Masculino de 67 años
CONTROL AM	Femenino de 58 años	CONTROL AM	Masculino de 72 años
CONTROL AJ	Femenino de 23 años	CONTROL AJ	Masculino de 27 años

Las siguientes gráficas muestran el número total de células teñidas con DAPI por sujeto en el grupo femenino y masculino.

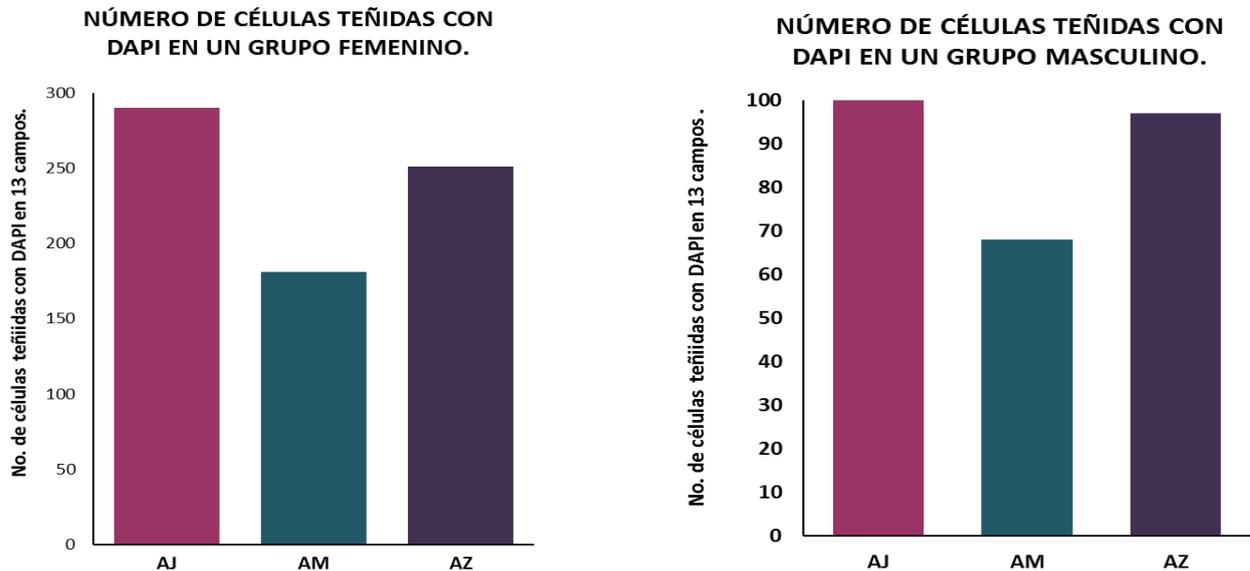


Figura 13. Número de células teñidas con DAPI en un grupo femenino y masculino.

La imagen muestra el recuento en 13 campos aleatorios del número de células teñidas con DAPI en los pacientes femenino y masculino con enfermedad de Alzheimer (AZ) y sus controles correspondientes, adultos mayores (AM) y adultos jóvenes (AJ).

Las gráficas muestran que en los sujetos AJ se cuantificó un mayor número de núcleos y que en ambos casos los pacientes AZ tienen un mayor número de núcleos teñidos que los controles AM.

8.1 Determinación del número de células Ki-67 positivas en los cultivos, de pacientes y sus controles.

Para esta tinción utilizamos el fluorocromo FITC que sirve como sustancia marcadora para la visualización de la proteína ki-67 que es un marcador de proliferación celular.

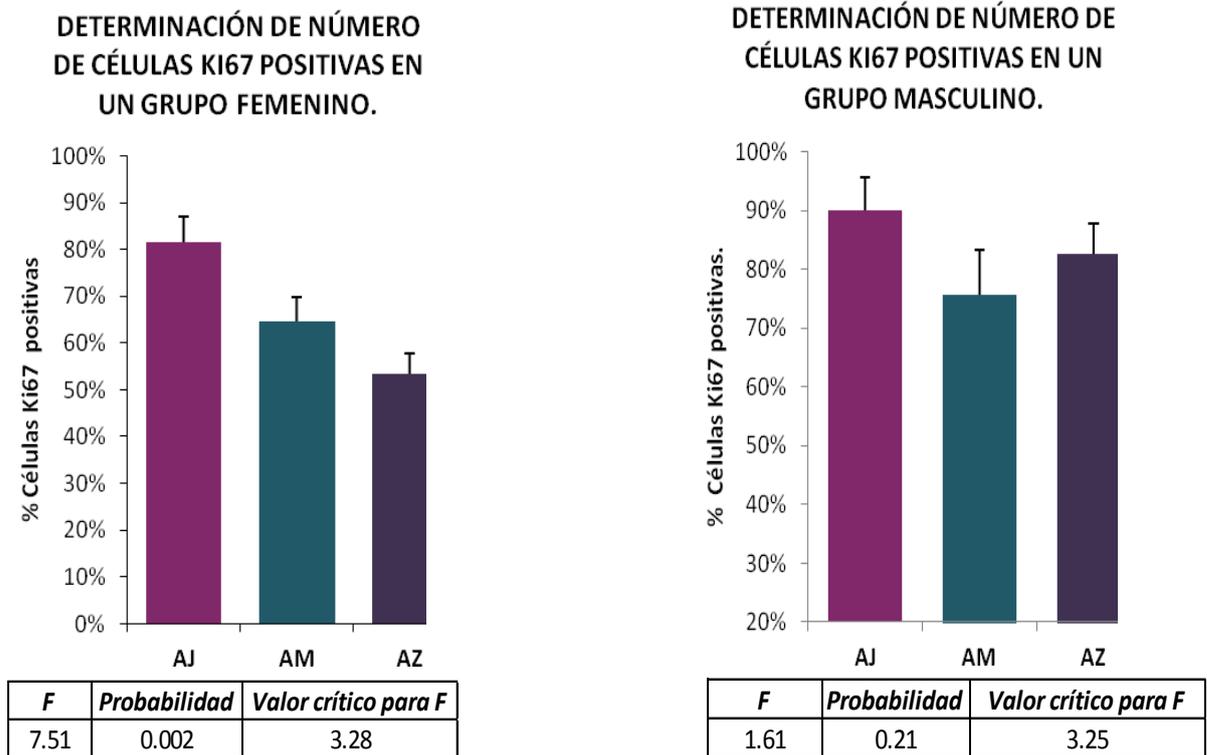


Figura 14. Número de células Ki-67 positivas en un grupo femenino y masculino.

La imagen muestra el recuento en 13 campos aleatorios del número de células Ki-67 positivas en los pacientes femenino y masculino con enfermedad de Alzheimer (AZ) y sus controles correspondientes, adultos mayores (AM) y adultos jóvenes (AJ).

Las gráficas muestran que en ambos grupos en los sujetos AJ se cuantificó un mayor número de células Ki-67 positivas. En el grupo femenino la paciente con AZ tuvo menor número de células Ki-67 positivas que su control AM. En el grupo masculino sucedió lo contrario, en el paciente AZ se cuantificó un mayor número de células Ki-67 positivas que en el control masculino AM.

9. Discusión

En este trabajo encontramos que la participante femenina con diagnóstico de Alzheimer tiene disminuida la tasa neurogénica en un 12% en relación a la AM y de 29 % en la AJ. En tanto que el participante masculino AZ tuvo disminuida la tasa neurogénica en un 7% en relación al AJ y superó en 7% al AM.

El método que utilizamos para determinar la tasa neurogénica fue detectar a la proteína Ki-67 que es un marcador de proliferación, útil para señalar a las células neurogénicas (Kee et al 2002). Un análisis detallado del ciclo celular mostró que este antígeno está presente en los núcleos de las células en Fases G1, S y G2 del ciclo celular, así como en la mitosis (Scholzen & Gerdes, 2000), pero no en células en reposo o en reposo en la fase G0 (Gerdes et al., 1984). Además, Kee, Sivalingam, Boonstra, & Wojtowicz (2002) compararon la proteína Ki con el BrdU dentro de la zona proliferativa de la circunvolución dentada del hipocampo y encontraron que el número de células teñidas con un anticuerpo dirigido contra la proteína Ki-67 fue semejante a las que incorporaron el BrdU. Por lo tanto, concluyeron que Ki-67 es un marcador mitótico efectivo y tiene la mayoría de los beneficios de BrdU y a menor costo. Por lo anterior, en este trabajo lo utilizamos y normalizamos nuestros resultados entre el número de células presentes en cada campo microscópico.

Estudios recientes encontraron que en las células en interfase, la proteína Ki-67 está localizada en el núcleo. En G2 se acumula en el nucléolo y al inicio de la mitosis se reubica en la periferia de los cromosomas donde permanece hasta la formación de nuevo del núcleo en fase G1 después de la segregación de los cromosoma (Sales & Vagnarelli., 2018). Después de esto, la proteína Ki-67 se distribuye primero en focos pequeños y luego se une en los nucléolos (Sales & Vagnarelli., 2018).

En nuestro estudio, encontramos que la localización de Ki-67 en los 3 grupos de edad, es variable. Es decir, en la mayoría de los campos Ki-67 se ubica conglomerado dentro de los núcleos de las células en formas redondeadas muy bien definidas. Sin embargo, encontramos campos en donde se observa esta proteína dispersa dentro de los núcleos. Es decir muchos puntos de ki-67 distribuidos sobre toda la superficie del núcleo. Además, en algunos campos, en su mayoría de los AJ observamos un viso de color

verde sobre todo el cuerpo celular, incluso en campos confluentes en donde no se observaron células marcadas con el anticuerpo contra la proteína Ki-67.

Cabe señalar que en el control de cada preparación no se observó autofluorescencia. Sobre esto es necesario descartar que esta distribución no sea causada por algún efecto del medio de montaje u otro error de manejo. En el futuro se espera poder contabilizar el porcentaje de fluorescencia de ki67 de cada uno de los sujetos de este estudio y observar si las diferencias pueden ir más allá de ser células positivas o no, y establecer si además de esto podemos encontrar diferencias en la cantidad de ki-67 total.

Nuestros resultados apoyan las observaciones descritas sobre los gradientes y la localización de Ki-67 durante el ciclo celular, las cuales indican que en las células en interfase la proteína Ki-67 está localizada en el núcleo, en G2 se acumula en el nucléolo y al inicio de la mitosis se reubica en la periferia de los cromosomas donde permanece hasta la formación de nuevo del núcleo en fase G1 después de la segregación del cromosoma (Sales & Vagnarelli., 2018). Después de esto, la proteína Ki-67 se distribuye primero en focos pequeños y luego se une en los nucléolos (Sales & Vagnarelli., 2018). Además de que en quiescencia, los niveles de Ki-67 disminuyen gradualmente y cuando las células vuelven a entrar en el ciclo celular, los niveles de la proteína Ki-67 disminuyen en función del tiempo en que permanecieron quiescentes.

Previamente se reportó que en la vejez las células madre neurales pierden su potencial proliferativo y se vuelven inactivas, esto porque al envejecer los inhibidores de la neurogénesis aumentan (Kuhn, Dickinson-Anson & Gage, 1996) (Drapeau & Abrous, 2008), lo que supone que la tasa de proliferación del epitelio olfatorio también se vería reducida. Actualmente se presume que este proceso puede reactivarse con ciertos estimulantes como el ejercicio, la restricción calórica, o con algún otro tipo de sustancia como el resveratrol, ya que esta última está vinculada a la activación de sirtuinas y a la longevidad. Esto se demostró al administrarla en ratones de seis meses de edad y observar mejoría de la neurogénesis hipocámpal, la plasticidad cerebral y la cognición, indicando que la plasticidad del SNC se conserva en cierta medida en un organismo envejecido (Katsimpardi and Lledo., 2018).

En este caso, nuestros resultados apoyan que disminuye la neurogénesis con la edad como se mostró en el modelo de ratas envejecidas de Kuhn, Dickinson-Anson & Gage (1996) donde usando bromodeoxiuridina (BrdU), confirmaron que la neurogénesis se redujo drásticamente. Esta disminución fue acompañada por una inmunorreactividad

reducida para la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas, una molécula que participa en la migración y el proceso de elongación de las neuronas en desarrollo. (Kuhn, Dickinson-Anson & Gage, 1996)

También encontramos que hay una correlación entre la disminución de la neurogénesis (entendida como el cociente del número de células ki-67 positivas entre el número de células por campo) de las neuronas olfatorias mantenidas ex vivo y el volumen del hipocampo de los participantes con AZ apreciado por Resonancia Magnética. En este sentido se observó que el sujeto femenino con EA mostró una tasa neurogénica menor de los precursores neuronales olfatorios mantenidos ex vivo y una disminución del volumen cortical y subcortical supratentorial y del hipocampo. En el participante masculino con diagnóstico de EA se encontró una correlación semejante. Éste mostró una tasa neurogénica estimada ex vivo en los precursores neuronales semejante a la del adulto mayor y un volumen del hipocampo de dimensiones semejantes a lo reportado en sujetos sin alteraciones cognitivas (Braskie & Thompson, 2013).

Los resultados del grupo masculino podrían explicarse retomando la interpretación de la resonancia magnética de encéfalo del paciente, en donde el sistema ventricular infra y supratentorial se encontró conservado y las alteraciones como pérdida de sustancia subcortical y la atrofia cortico subcortical son discretos y leves. Además es fundamental tomar en cuenta que la EA afecta mayormente a mujeres y quizá esto tenga relación con los factores involucrados en la modulación y regulación de la neurogénesis como las hormonas. Entre estos factores destaca también el aprendizaje (Lledo, Alonso & Grubb, 2006), y en este estudio observamos que la paciente femenina con AZ poseía una escolaridad menor (media superior) al paciente masculino con AZ (superior) lo que podría verse reflejado en el cultivo.

Los hallazgos mostrados en las tasas neurogénicas de los pacientes masculino y femenino con EA también se correlacionan con las alteraciones conductuales reportadas y el puntaje obtenido en la prueba minimental.

En cuanto a la tasa de proliferación de los participantes jóvenes (AJ) y los adultos con edad mayor a 50 años se encontró que se correlacionan con la edad. Los sujetos más jóvenes mostraron una tasa neurogénica mayor, en tanto que los AM mostraron una tasa neurogénica menor.

Estos resultados sugieren que una persona con EA tendría una tasa menor de proliferación determinada ex vivo en los precursores neuronales olfatorios que un AM sin esta enfermedad. Estos resultados sugieren que en un futuro la determinación ex vivo de la tasa neurogénica de los precursores neuronales olfatorios podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de la EA. Esta prueba junto con el uso de resonancias magnéticas estructurales (RM), y la prueba del minimental para evaluar el estado cognitivo de pacientes con EA permitirán en un futuro realizar un diagnóstico más preciso de esta enfermedad.

Recientemente, en nuestro laboratorio se encontraron agregados intracitoplasmáticos de la proteína tau en los participantes con EA, en el caso de la paciente femenina de este estudio se observó que estos agregados se encuentran dentro del núcleo y en el citoplasma de las células, mientras que en el paciente masculino se encuentran predominantemente en el núcleo, por lo que podemos pensar que quizá esta localización de proteína tau podría influir en la tasa de proliferación de los precursores neuronales olfatorios, pues se ha visto que en el giro dentado del hipocampo los oligómeros $\alpha\beta 42$ (que se acumulan en los cerebros con EA) estimulan principalmente la proliferación de los progenitores de células granulares, pero cuando estos oligómeros quedan atrapados en las placas fibrilares propias de esta enfermedad, los neuroblastos recién formados no pueden madurar o sobrevivir (Armato et al, 2013). De tal modo que quizá sucede lo mismo en los precursores neuronales del neuroepitelio olfatorio, pues en este modelo ya se tienen datos que demuestran la presencia de marañas neurofibrilares (Artículo en preparación).

Esta evidencia sugiere que a pesar de que el paciente tenga un mayor número de precursores neuronales olfatorios, estos no llegan a madurar y en consecuencia su capacidad olfatoria se ve comprometida, lo que aporta evidencia adicional para sustentar que las pruebas de percepción e identificación olfatoria constituyen una buena herramienta para el diagnóstico de esta enfermedad.

10. Conclusiones

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de células Ki.67 positivas en los pacientes con EA demostraron que la disminución en la formación de nuevas neuronas (neurogénesis) en los precursores neuronales olfatorios está asociada a la disminución del volumen del hipocampo, y que esta tasa de proliferación correlaciona con la capacidad cognitiva determinada con el test *Minimental*. Además de que la tasa de proliferación de los precursores neuronales olfatorios se correlaciona con la edad del sujeto.

Finalmente, nuestros resultados apoyan que los precursores neuronales del epitelio olfatorio constituyen un modelo subrogado de las neuronas del SNC útil para estudiar alteraciones en la diferenciación y proliferación neuronal en enfermedades psiquiátricas como el Alzheimer.

11. Referencias

- 1) Adelstein, J. S., Shehzad, Z., Mennes, M., Deyoung, C. G., Zuo, X. N., Kelly, C., Margulies, D. S., Bloomfield, A., Gray, J. R., Castellanos, F. X., ... Milham, M. P. (2011). Personality is reflected in the brain's intrinsic functional architecture. *PloS one*, 6(11), e27633.
- 2) Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965; 124:319–335. [PubMed: 5861717]
- 3) Alzheimer A. (1911) Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*; 4: 356–85.
- 4) American Psychiatric Association., Kupfer, D. J., Regier, D. A., Arango López, C., Ayuso-Mateos, J. L., Vieta Pascual, E., & Bagney Lifante, A. (2014). *DSM-5: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (5a ed.)*.
- 5) Arnold, S. E., Lee, E. B., Moberg, P. J., Stutzbach, L., Kazi, H., Han, L. Y., Lee, V. M., ... Trojanowski, J. Q. (2010). Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Annals of neurology*, 67(4), 462-9.
- 6) Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M., Romo, F., Calixto, E., Solís Chagoyán, H., Jiménez, M., Montaña, L., et al. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of neuroscience methods* 201, 35-45.
- 7) Bordey, Angelique. (2006). *Adult Neurogenesis: Basic Concepts of Signaling. Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 5. 722-8. 10.4161/cc.5.7.2614.
- 8) Braskie, M.N. et al. (2010) Plaque and tangle imaging and cognition in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 31, 1669–1678
- 9) Braskie, M.N., Thompson, P.M. Understanding cognitive deficits in Alzheimer's disease based on neuroimaging findings. *Trends Cogn Sci*. 2013;17:510–516
- 10) Broad, K. (2017) Mechanisms and potential treatments for declining olfactory function and neurogenesis in the ageing brain. *Journal of Gerontology and Geriatrics*. Vol. 65. Pp. 93-100.
- 11) Doty, R., Shaman, P. and Dann, M. (1984a). Development of the university of Pennsylvania smell identification test: A standardized microencapsulated test of olfactory function. *Physiology & Behavior*, 32(3), pp.489-502.

- 12) Doty, R., Shaman, P., Applebaum, S., Giberson, R., Siksorski, L. and Rosenberg, L. (1984b). Smell identification ability: changes with age. *Science*, 226(4681), pp.1441-1443.
- 13) Doty, R.L. (1991). *The Human Sense of Smell*, ed. D.G Laing. R.L. Doty, and W. Breiphol. Berlin: Springer –Verlag.
- 14) Drew, L. (2018) An age-old story of dementia. . *Nature*, 559 (7715), S2-S3. Doi: 10.1038/d41586-018-05718-5.
- 15) Farbman A. Developmental biology of olfactory sensory neurons. *Semin Cell Biol.* 1994 Feb; 5(1):3-10.
- 16) Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12(3):189-98.
- 17) Fuentes, A., Fresno, M., Santander H., Valenzuela S., Gutierrez, M., & Miralles, R. (2011) Sensopercepción olfatoria: una revisión. *Rev. méd. Chile* [online]. vol.139, n.3, pp.362-367. ISSN 0034-9887. [://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000300013](https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000300013).
- 18) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710–1715.
- 19) Ghoshal, N., et al., 2002. Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 177, 475-493.
- 20) Gratzner HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474–75
- 21) Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, and H. M. Wisniewski. 1986. Microtubule-associated protein tau: A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261: 6084–6089
- 22) Johansson, L., Guo, X., Duberstein, P. r., Hällström, T., Waern, M. Ostling, et al. (2014). Midlife personality and risk of Alzheimer disease an distress. A 38-year follow-up. *Neurology*, 83 (17), 10538-10544. doi: 10.1212/WNL.0000000000000907
- 23) Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., & Wojtowicz, J. M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods*, 115, 97–105

- 24) Kochhann, R., Cerveira, M. O., Godinho, C., Camozzato, A., & Chaves, M. (2009). Evaluation of Mini-Mental State Examination scores according to different age and education strata, and sex, in a large Brazilian healthy sample. *Dementia & neuropsychologia*, 3(2), 88-93.
- 25) Korolev, I. (2014) Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*. 4(Fall):24-33.
- 26) Kuhn, H., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 16(6), 2027–2033. doi:10.1523/jneurosci.16-06-02027.1996
- 27) Leopold et al., Anterior Distribution of Human Olfactory Epithelium. *Laryngoscope*. 2000 Mar;110(3 Pt 1): 417-21.
- 28) Lledo, P.-M., Alonso, M., y Grubb, MS (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:179-193. doi: 10.1038 / nrn1867
- 29) Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. DSM-IV. (1995). Masson. Barcelona.
- 30) Masters, C., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C., Sperling, R., & Cummings, J. (2015, October 15) Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, Vol. 1. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/nrdp201556>.
- 31) Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*. 349 (9064): 1546–1549. Doi: 10.1016/S0140-6736(96)10203-8.
- 32) Mcadams, Dan & L Pals, Jennifer. (2006). A New Big Five: Fundamental Principles for an Integrative Science of Personality. *The American psychologist*. 61. 204-17. 10.1037/0003-066X.61.3.204.
- 33) Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005; 28:223–250. [PubMed: 16022595]
- 34) Molloy, W. & Caldwell, P. (2002) La enfermedad de Alzheimer: Una guía práctica para cuidadores y familiares. Barcelona, ed. Paidós
- 35) Morgan, C. D., Nordin S., Murphy C., (1995) Odor identification as an early marker for Alzheimer's disease: impact of lexical functioning and detection sensitivity, *J. Clin. Exp. Neuropsychol*. 17. 793–803

- 36) Mumenthaler, M. & Mattle, H. (2006) Fundamentals of Neurology. Thieme: Stuttgart and New York.
- 37) Murphy, C., Schubert, C.R., Cruickshanks, K.J., Klein, B.E., Klein, R., Nondahl, D.M. 2002. Prevalence of olfactory impairment in older adults. *J. Am. Med. Assoc.* 288: 2307-2312
- 38) R.M. Crm, J.C. Anthony, S.S. Bassett and M.F. Folsterin. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *Journal of the American Medical Association* 1993;269(18):2386-239.
- 39) Schubert CR, Cruickshanks KJ, Nondahl DM, et al. (2003) Association of exercise with lower long-term risk of olfactory impairment in older adults. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 139:1061-6.
- 40) Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 2001;410(6826):372–76. [[PubMed](#)]
- 41) Smart I. 1961. The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by autoradiography after [³H]-thymidine injection. *J. Comp. Neurol.* 116:325–27
- 42) Sorokin, S. P. (1988). The respiratory system. In *Cell and tissue biology: A textbook of histology* (L. Weiss, ed.), pp. 751–814. Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- 43) Torres-Perez M et al.: Resveratrol enhances neuroplastic changes, including hippocampal neurogenesis, and memory in Balb/C mice at six months of age. *PLoS ONE* 2015, 10: e0145687.
- 44) Vandenberghe R, Tournoy J. (2005) Envejecimiento cognitivo y enfermedad de Alzheimer. *Revista médica de posgrado* 2005; 81: 343-352.
- 45) Wang, Q. S. & Zhou, J. N. (2002). *Retrieval and encoding of episodic memory in normal aging and patients with mild cognitive impairment.* *Brain Research.* 924:113-115.
- 46) Weiler E., Benali A. Olfactory epithelia differentially express neuronal markers. *J Neurocytol.* 2005 Sep;34(3-5):217-40. Epub 2006 Jul 13.
- 47) Yasar B, Linton K, Slater C, Byers R (2016) Primary cilia are increased in number and demonstrate structural abnormalities in human cancer. *J Clin Pathol* (in press) Google Scholar

17 de marzo de 2019

Mtra. Angélica Fabiola Sánchez Gutiérrez
Jefa de Programas Educativos
Centro de Investigación en Ciencias Cognitivas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
PRESENTE

Por medio de la presente le comunico que he leído la tesis "ALZHEIMER Y ENVEJECIMIENTO. Correlato entre el estado cognitivo y la proliferación de precursores neuronales en un modelo *ex vivo*" que presenta la alumna:

Claudia Ivonne Mejía Mondragón

para obtener el grado de Maestro/a en Ciencias Cognitivas. Considero que dicha tesis está terminada por lo que doy mi **voto aprobatorio** para que se proceda a la defensa de la misma.

Bajo mi decisión en lo siguiente:

La tesis contiene los conceptos necesarios para sustentar la hipótesis. Los datos experimentales están bien descritos y discutidos.

Sin más por el momento, quedo de usted

Atentamente


Dra. Gloria Benitez King



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Mtra. Angélica Fabiola Sánchez Gutiérrez
Jefa de Programas Educativos
Centro de Investigación en Ciencias Cognitivas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
PRESENTE

Por medio de la presente le comunico que he leído la tesis "ALZHEIMER Y ENVEJECIMIENTO. Correlato entre el estado cognitivo y la proliferación de precursores neuronales en un modelo *ex vivo*" que presenta la alumna:

Claudia Ivonne Mejía Mondragón

para obtener el grado de Maestra en Ciencias Cognitivas. Considero que dicha tesis está terminada por lo que doy mi **voto aprobatorio** para que se proceda a la defensa de la misma.

Bajo mi decisión en lo siguiente:

En el desarrollo apropiado de la tesis que abarca la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento en su magnitud.

Sin más por el momento, quedo de usted

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, CdMx, 7 de mayo de 2019.

Rosalinda Guevara Guzmán
Doctora en Ciencias Biomédicas

30 de abril de 2019

Mtra. Angélica Fabiola Sánchez Gutiérrez
Jefa de Programas Educativos
Centro de Investigación en Ciencias Cognitivas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
PRESENTE

Por medio de la presente le comunico que he leído la tesis "ALZHEIMER Y ENVEJECIMIENTO. Correlato entre el estado cognitivo y la proliferación de precursores neuronales en un modelo *ex vivo*." que presenta la alumna:

Claudia Ivonne Mejía Mondragón

para obtener el grado de Maestro/a en Ciencias Cognitivas. Considero que dicha tesis está terminada, por lo que doy mi **voto aprobatorio** para que se proceda a la defensa de la misma.

Baso mi decisión en lo siguiente: la tesis reúne los requisitos teóricos y metodológicos esperados para una tesis de maestría y la acepto para su réplica oral en el examen de grado.

Sin más por el momento, quedo de usted

Atentamente



Dr. Antonio García Anacleto

22.03.2019.

Mtra. Angélica Fabiola Sánchez Gutiérrez
Jefa de Programas Educativos
Centro de Investigación en Ciencias Cognitivas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
PRESENTE

Por medio de la presente le comunico que he leído la tesis "**ALZHEIMER Y ENVEJECIMIENTO. Correlato entre el estado cognitivo y la proliferación de precursores neuronales en un modelo *ex vivo***" que presenta la alumna:

Claudia Ivonne Mejía Mondragón

para obtener el grado de Maestro/a en Ciencias Cognitivas. Considero que dicha tesis está terminada por lo que doy mi **voto aprobatorio** para que se proceda a la defensa de la misma.

Bajo mi decisión en lo siguiente:

El trabajo realizado por la alumna Claudia Ivonne es en mi opinión extraordinario. Considerando que al inicio de su trabajo de investigación ella no tenía bien las bases fisiológicas ni conocía las técnicas experimentales ella ha realizado un excelente trabajo que culminó en una tesis que seguramente funge como una tesis ejemplo en la maestría en Ciencias Cognitivas. Felicito a la alumna tanto por el monto de trabajo que ha realizado en este periodo de tiempo así como la alta calidad que tiene.

Sin más por el momento, quedo de usted

Atentamente



Dr. Markus Franziskus Müller Bender

22 mayo 2019

Mtra. Angélica Fabiola Sánchez Gutiérrez
Jefa de Programas Educativos
Centro de Investigación en Ciencias Cognitivas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
PRESENTE

Por medio de la presente le comunico que he leído la tesis "Alzheimer y envejecimiento. Correlato entre el estado cognitivo y la proliferación de precursores neuronales en un modelo *ex vivo*" que presenta la alumna:

Claudia Ivonne Mejía Mondragón

para obtener el grado de Maestro/a en Ciencias Cognitivas. Considero que dicha tesis está terminada por lo que doy mi **voto aprobatorio** para que se proceda a la defensa de la misma.

Bajo mi decisión en lo siguiente:

Planteamiento del problema. El problema ha sido planteado de manera aceptable, aunque considero que podría haberse presentado mejor.

Metodología y procedimientos para resolver el problema y responder la pregunta. La metodología planteada, aunque puede ser mejorada en diversos aspectos es suficiente.

Robustez de la evidencia presentada. Aunque se presentan resultados de un individuo por condición (Alzheimer, adulto mayor y un joven por cada sexo) que no permite realizar inferencias estadísticas, el trabajo representa un estudio piloto que puede considerarse para futuras investigaciones.

Fuentes consultadas. En general, las fuentes consultadas por el alumno son confiables y de autoridades reconocidas.

Concisión del ensayo. El trabajo en general se presenta de manera concisa.

Uso, interpretación y explicación de la información. El alumno emplea la información y la interpreta de manera satisfactoria.

Establecimiento de una opinión y manejo de información. El alumno discute de manera aceptable los resultados aunque considero que debería haber incluido más autocrítica.

Secuencia y progresión lógica. La presentación de las ideas y el uso de la información son presentados de manera aceptable.

Presentación unificada del manuscrito. Las ideas presentadas, tanto las evidencias y la información, así como la opinión, están unificadas.

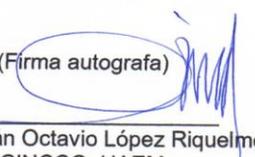
Jerga y "paja". El ensayo emplea de manera aceptable la jerga del tema tratado y no contiene "paja".

Formato. La tesis presentada tiene un formato aceptable aunque podría especificar de mejor manera la hipótesis y los objetivos del trabajo.

Sin más por el momento, quedo de usted

Atentamente

(Firma autografa)


Dr. Germán Octavio López Riquelme
CINCCO, UAEM