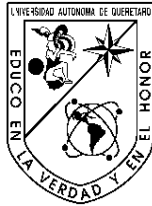


Isnarhazni Alejandra
Calero Vargas

2018 Efecto de la administración oral de D-serina sobre la flexibilidad cognitiva
y la atención en ratas.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

Nombre de la tesis:

Efecto de la administración oral de D-serina sobre la
flexibilidad cognitiva y la atención en ratas.

Tesis:

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta:

Isnarhazni Alejandra Calero Vargas

Nombre del aspirante

Dirigida por:

Dra. en C. Mónica Andrea López Hidalgo

Querétaro, Qro. Diciembre del 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Medicina
 Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE D-SERINA SOBRE LA FLEXIBILIDAD COGNITIVA Y LA ATENCIÓN EN RATAS

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta:

L.M Isnarhazni Alejandra Calero Vargas

Dirigida por:

Dra. Mónica Andrea López Hidalgo

SINODALES

Dra. Mónica Andrea López Hidalgo
 Presidente

Firma

Dr. Julián Reyes López
 Secretario

Firma

Dra. Nancy Hernández Chan
 Vocal

Firma

Dr. Fernando Peña Ortega
 Suplente

Firma

Dr. Rubén Domínguez Pérez
 Suplente

Firma

Dra. Guadalupe Caldivar Lelo de la Larrea
 Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
 Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
 Querétaro, Qro. Diciembre del 2018

RESUMEN

La D-serina es un D-aminoácido dextrógiro (D) formado por catálisis por la enzima serina racemasa a partir del aminoácido levógiro (L) L-serina. Actualmente se le reconoce como el principal co-agonista endógeno de los receptores glutamatérgicos NMDA, por lo que está implicada en diversos tipos de la plasticidad sináptica y procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Los niveles cerebrales de la D-serina se encuentran disminuidos en ratas viejas, por lo que nos planteamos si este aminoácido participaba en la disminución de la atención y la flexibilidad cognitiva que ocurren como un proceso natural del envejecimiento. Para esto, se analizó la flexibilidad cognitiva y la atención en ratas macho de la cepa *Wistar* de 6, 12 y 18 meses de edad. Como era de esperarse, ambas funciones declinan con la edad, siendo el desempeño de las ratas de 18 meses el más pobre. De manera interesante, las ratas de 18 meses a las que se les administró crónicamente D-serina, 2 meses antes de la evaluación de flexibilidad cognitiva y atención, presentaron un mayor desempeño en las evaluaciones de flexibilidad cognitiva y atención, que las ratas de la misma edad que no fueron tratadas con D-serina, haciéndose comparable incluso, con el desempeño de las ratas jóvenes. Con este trabajo, podemos concluir que la disminución de la D-serina contribuye al deterioro de la atención y la flexibilidad cognitiva. Nuestros resultados sugieren que la administración D-serina podría ser utilizada como un potenciador de las funciones cognitivas que disminuyen con la edad.

(Palabras clave: D-serina, flexibilidad cognitiva, atención)

SUMMARY

The D-serine is a D-aminoacid catalyzed by serine racemase from L-serine. Currently, it's known as the main endogenous co-agonist of the glutamatergic NMDA receptors. D-serine is essential for the induction of several types of synaptic plasticity and cognitive processes such as learning and memory. D-serine levels are diminished in aged rats, which could account for the deterioration of attention and cognitive flexibility that occur as a natural process of aging. To analyze this, cognitive flexibility and attention were analyzed in male *Wistar* rats of 6, 12 and 18 months old. As expected, both functions decline with age, being the performance of 18-month rats, the most affected. Interestingly, 18-month old rats that were chronically treated with D-serine (2 months before cognitive flexibility and attention evaluation) presented a higher performance in cognitive flexibility and attention compared to those that did not receive D-serine, becoming comparable even with the performance of young rats. These results suggest that D-serine could be used as a cognitive enhancer to restore cognitive functions that decline during healthy aging.

(Key words: D-serine, cognitive flexibility, attention)

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mi esposo y a mi hija, por ser la inspiración para seguir mis sueños, por su amor y apoyo incondicional.

Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme brindado el apoyo para realizar este proyecto de investigación. No. CVU 786125

Agradezco a la **Universidad Autónoma de Querétaro** por el apoyo en la realización de esta investigación.

De manera especial quiero agradecer a mi directora de tesis **Dra. Mónica Andrea López Hidalgo** por siempre estar dispuesta a ayudarme, por compartir sus conocimientos y por tenerme paciencia durante esta etapa de aprendizaje.

A mis sinodales que siempre mostraron interés, y disponibilidad para compartir sus conocimientos, y brindar las aportaciones necesarias.

Tabla de contenidos

1. INTRODUCCIÓN	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. MARCO TEORICO.....	10
3.1. Cambios morfológicos en el SNC asociados al envejecimiento.....	10
3.2. Cambios funcionales en el SNC asociados al envejecimiento	11
3.3. Flexibilidad cognitiva	13
3.4. Atención	14
3.5. D-serina y su papel como co-agonista de los NMDAR	15
3.6. Metabolismo de la D-serina	15
3.7. Liberación de D-serina en diferentes etapas del desarrollo.	17
3.8. Efecto de la D-serina en los procesos cognitivos en ratas y humanos	17
3.9. D-serina y envejecimiento.....	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVO GENERAL.....	20
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
8. MATERIAL Y MÉTODOS	20
8.2. Definición del universo	20
8.3. Tamaño de la muestra	21
8.4. Definición de las variables	21
8.5. Definición del grupo de comparación	21
8.6. Definición del grupo a intervenir.....	21
8.7. Criterios de inclusión.....	21
8.8. Criterios de eliminación	22
8.9. Definición de variables y unidades de medida	22
8.10. Metodología	23
8.11. Sujetos	23
8.12. Droga	23
8.13. Toxicidad de la D-serina	24
8.14. Experiencia de los investigadores en el manejo de animales	24
8.15. Equipo.....	24

8.16. Entrenamiento.....	25
8.17. Prueba de evaluación de la flexibilidad cognitiva	26
8.18. Prueba de evaluación de Atención.....	26
8.19. Análisis del efecto de la administración oral de D-serina sobre el deterioro en la Flexibilidad cognitiva y la Atención.....	27
8.20. Eutanasia	27
8.21. Diseño experimental	29
8.22. Prueba piloto.....	29
8.23. Definición del plan de procesamiento y presentación de la información ...	29
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
9.1. Adquisición de la tarea.....	30
9.3. Caracterización de flexibilidad cognitiva en ratas de 6, 12 y 18 meses	31
9.3. Caracterización de la atención en ratas de 6, 12 y 18 meses.....	34
9.4. Caracterización de la actividad locomotora en ratas de 6, 12 y 18 meses..	37
9.5. Efecto de la D-serina sobre la flexibilidad cognitiva y la atención en ratas de 18 meses	38
9.6. Efecto de la D-serina sobre la actividad locomotora en ratas de 18 meses	43
9.7. Correlación de la actividad locomotora con flexibilidad cognitiva y atención en ratas de 6, 12 y 18 meses.....	45
9.8. Correlación de la actividad locomotora con flexibilidad cognitiva y atención en ratas de 18 meses tratadas con D-serina	46
10. BIBLIOGRAFÍA	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de variables y unidades de medida.....	23
--	----

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central está formado por una compleja red de neuronas cuyo funcionamiento se expresa en diversas capacidades cognitivas asociados al comportamiento humano, tales como el aprendizaje, la memoria, la atención y la flexibilidad cognitiva. Estas redes neuronales se comunican entre sí mediante sinapsis eléctricas o químicas, siendo esta última la más utilizada. La sinapsis química depende de la liberación de neurotransmisores por parte de la terminal presináptica tales como la acetilcolina, la noradrenalina, GABA, el glutamato, entre otros. Estos actúan sobre receptores localizados en las neuronas postsinápticas e inducen cambios en las respuestas neuronales.

Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), son receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópicos. Se encuentran formados por subunidades NR1 y NR2. La subunidad NR2, contienen el sitio de unión a Glutamato, mientras que, en la NR1 se localiza el sitio de unión para el co-agonista (D-serina o glicina). Debido a que en condiciones de reposo el Mg^{+2} se encuentra bloqueando el poro del canal, es necesario, para la activación de estos receptores, que además de la presencia de Glutamato y el co-agonista, ocurra de manera simultánea, una despolarización de la membrana para remover el Mg^{+2} , lo que le permite funcionar al receptor como un detector de coincidencia [1]. Los NMDAR están implicados en diversos tipos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP) [2]. La LTP es el incremento en la transmisión sináptica que persiste por horas e incluso días. Es considerada como la base celular del aprendizaje y la memoria por lo que cambios en la inducción del LTP se reflejan en cambios en estos dos procesos [3]. Otro tipo de plasticidad neuronal que depende de la función de los NMDAR es la flexibilidad cognitiva [4], que es la habilidad de un animal de adaptar estrategias previamente aprendidas para enfrentar nuevas experiencias [5].

Las alteraciones en la función de los NMDAR han sido relacionadas con diversos procesos patológicos como la enfermedad de Parkinson [6], Alzheimer [7], Esquizofrenia [8], entre otros y fisiológicos como el envejecimiento [9,10]. En este

sentido, estudios con ratas viejas han mostrado una disminución en las respuestas sinápticas mediadas por NMDAR que se correlacionan con una disminución en las funciones ejecutivas tales como el aprendizaje, la memoria y la flexibilidad cognitiva [9].

Diversos estudios han mostrado que la D-serina es el principal co-agonista de los NMDAR y que es necesaria para la LTP, el aprendizaje y la memoria en ratas jóvenes [11] Las concentraciones intracerebrales de D-serina cambian dependiendo de la etapa del desarrollo. Los niveles máximos se alcanzan entre los 20 y los 40 días postnatales y, a partir de ahí disminuyen gradualmente con la edad y se correlacionan con la expresión de los NMDAR [12, 13,]. La LTP en ratas viejas se encuentra disminuida en comparación con ratas jóvenes. De manera interesante, algunos estudios han encontrado que la administración de D-serina exógena en ratas viejas, facilito la inducción y aumento la magnitud de la LTP haciéndola comparable con la de las ratas jóvenes [13,14]. Esto sugiere que la deficiencia de D-serina podría estar relacionada con la disminución en las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento. En este sentido, el presente proyecto pretende estudiar el papel de la D-serina en el inicio y progreso del deterioro de las funciones cognitivas debido a la edad, con el fin de disminuir e incluso prevenir el declive cognitivo asociado al envejecimiento.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los avances en materia de salud han permitido un aumento en la expectativa de vida de la población. Hace 5 décadas, la expectativa de vida era de 60 años mientras que hoy es de más de 75 [79]. A medida que se envejece, existe una disminución en la plasticidad sináptica y un deterioro progresivo de las funciones cognitivas [27,50,52]. La D-serina es esencial para diferentes procesos de plasticidad y participa en diversos procesos cognitivos [23,63,69], sin embargo, su papel en el deterioro de estos procesos asociado al envejecimiento ha sido poco estudiado.

3. MARCO TEORICO

3.1. Cambios morfológicos en el SNC asociados al envejecimiento

Debido a que el envejecimiento es un proceso multifactorial, es muy complicado establecer una sola teoría que lo explique. Sin embargo, este proceso posee una característica fundamental que es la disminución de la capacidad del organismo para mantener la homeostasis, es decir la incapacidad del sujeto para adaptarse a cambios en su medio interno y externo [17]. Las manifestaciones del envejecimiento se dan desde nivel molecular, hasta en órganos y sistemas. Uno de los sistemas afectados durante el envejecimiento, es el Sistema Nervioso Central (SNC) [21]. Estos cambios se reflejan como alteraciones morfológicas y funcionales [27,49,50,51,52,55,56]. Los cambios en el SNC no se dan de forma homogénea, ya que existen estructuras cerebrales más afectadas como son la corteza prefrontal y el hipocampo [47, 48]. Entre los cambios morfológicos, destaca una disminución progresiva en el volumen cerebral de ~20% (Fig. 1A) [55]. La pérdida de sustancia gris en los adultos mayores se observa principalmente en la corteza prefrontal [48]. La disminución de esta no es únicamente por la muerte neuronal, sino por la disminución en el tamaño, volumen, distribución y número de las espinas dendríticas [49, 17] (Fig.1B). En este sentido, Duan y colaboradores en el 2003, estudiaron

proyecciones corticocorticales de monos de 12 y 25 años y observaron una disminución de ~35% de las espinas dendríticas [49] (Fig. 1B). Los cambios cerebrales asociados al envejecimiento se extienden también a las células gliales, en donde se observa un aumento en la expresión de la Proteína Ácido Glial Fibrilar (GFAP) en cerebros de animales viejos en comparación con los de animales jóvenes [56,78], lo que indica una reactividad de los astrocitos durante el envejecimiento (Fig. 1C).

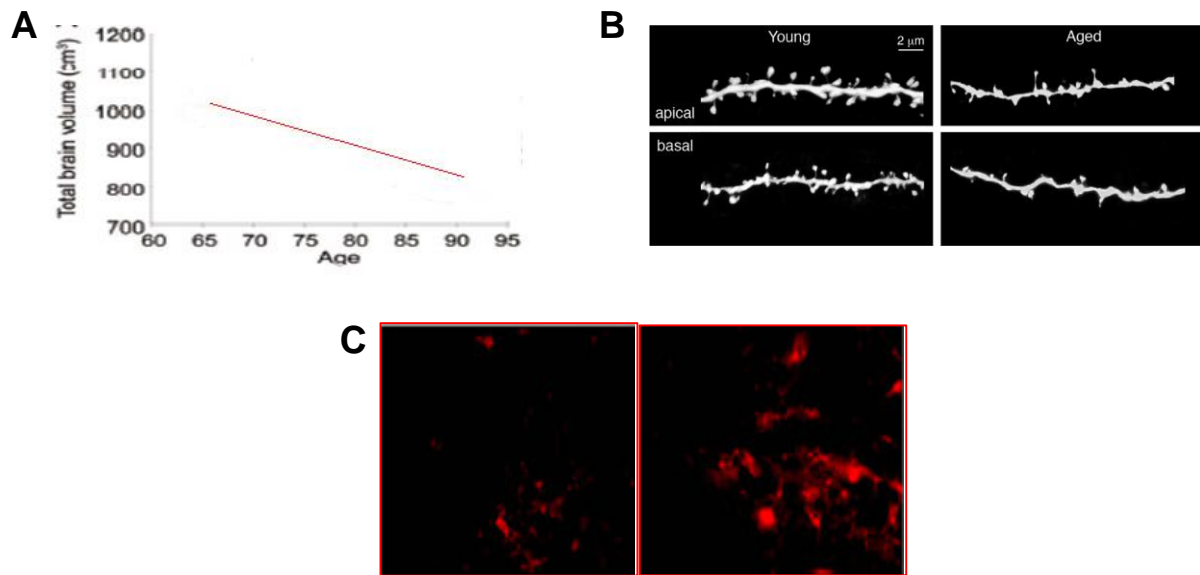


Fig.1 Cambios morfológicos cerebrales asociados al envejecimiento. (A) Efecto de la edad sobre el volumen total del cerebro. (B) microfotografía representativa de las espinas dendríticas apicales (superior) y basales (inferiores) en ratas jóvenes (izquierda) y viejos (derecha). (C) Cambios en la expresión de la Proteína Acido Glial Fibrilar (GFAP, rojo) en hipocampo en ratas jóvenes (izquierda) y viejos (derecha). Tomado de Driscoll et al., 2009; Luebke et al., 2010; Haley et al., 2010 respectivamente.

3.2. Cambios funcionales en el SNC asociados al envejecimiento

En paralelo a los cambios morfológicos, estudios longitudinales han encontrado que las funciones cognitivas cambian de acuerdo con la edad. En este sentido, diversos trabajos en humanos en donde se evalúa el aprendizaje [27,58], la memoria [50,59], la atención [52,60], entre otros, el máximo desempeño en las funciones cognitivas en los humanos se presenta entre los 25 y 30 años. Posterior a esto, estas funciones disminuyen de manera lenta y progresiva [50,51,59].

Cambios morfológicos y neuroquímicos de las neuronas asociados al envejecimiento se reflejan en cambios en la transmisión sináptica [18,70]. En particular, existe una disminución en el funcionamiento de los receptores glutamatérgicos tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) [21]. Los NMDAR se encuentran formados por dos subunidades: NR1 y NR2. La subunidad NR2, contienen el sitio de unión a Glutamato, mientras que en la NR1 se localiza el sitio de unión para el co-agonista (D-serina o glicina). Debido a que en condiciones de reposo el Mg^{+2} se encuentra bloqueando el poro del canal, es necesario, para la activación de estos receptores, que además de la presencia de Glutamato y el co-agonista, ocurra de manera simultánea, una despolarización de la membrana para remover el Mg^{+2} (Fig.2). Debido a que es necesaria la coincidencia de estos tres elementos, para que se pueda activar este receptor, se le considera a este un detector de coincidencia [1]. Por tales razones, los NMDAR son elementos esenciales para diversos tipos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP), ya que se ha visto que al bloquear estos receptores esta no se produce [11], la cual es considerada como la base celular del aprendizaje y la memoria [3]. En congruencia con su papel en la plasticidad sináptica, los NMDAR son importantes para las funciones ejecutivas como el aprendizaje, la memoria, la atención y la flexibilidad cognitiva [3,4, 9,11].

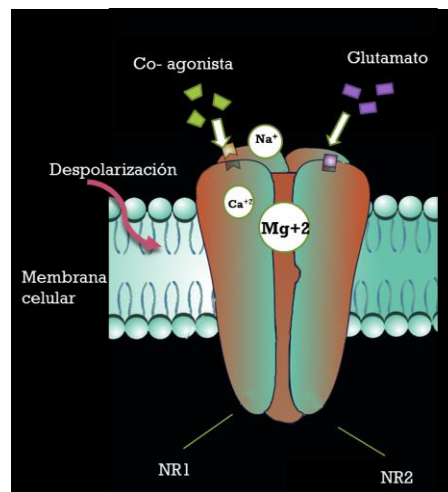


Fig.2 Esquema que representa los elementos que conforman al receptor NMDA. En la subunidad NR2, se encuentra su sitio de unión al glutamato y en la NR1 su sitio de unión a su co-agonista. Nótese que, en condiciones de reposo, el Mg^{+2} se encuentra obstruyendo el poro del receptor

En este aspecto el registro electrofisiológico de rebanadas de la corteza prefrontal de ratas de 6 y 14 meses de edad mostró una disminución en las corrientes mediadas por NMDAR en ratas viejas comparadas con las ratas jóvenes [60]. De manera interesante, en la evaluación de la atención en estas mismas ratas se observó que las ratas viejas presentaban un menor desempeño que las ratas jóvenes.

3.3. Flexibilidad cognitiva

La flexibilidad cognitiva se define como la habilidad de un animal de adaptar las estrategias previamente aprendidas para enfrentar nuevas experiencias [5]. Para la realización de esta función ejecutiva, es necesario que a nivel cortical y subcortical se den los siguientes procesos: identificar los cambios que ocurrieron en el ambiente, reconocer los elementos que cambiaron, comprender que la estrategia previa ya no es útil, inhibir la respuesta anterior y finalmente establecer una nueva estrategia. En estos procesos participan distintas áreas cerebrales, por ejemplo, la ínsula anterior y la corteza cingulada dorsal anterior participan en la detección de los cambios [80]; el *sulcus* intraparietal y el campo ocular frontal captan cuales fueron los cambios [81] y en respuesta a esto, la corteza frontal ventrolateral y frontal inferior inhiben la respuesta previa y posteriormente establecer una nueva estrategia [82].

El papel de los NMDAR en la flexibilidad cognitiva ha sido mostrado en diversos trabajos [42,51,54,53]. Por ejemplo, el bloqueo de los NMDAR en el estriado produjo una disminución de la flexibilidad cognitiva en ratas viejas en comparación con el grupo control [3, 51]. En este sentido, Stefani y Moghaddam encontraron que, al realizar una microinyección en la corteza prefrontal de ratas, con MK801, un inhibidor de los NMDAR, incrementaban el número de perseveraciones (consideradas como las permanencias de la respuesta errada) durante una prueba de cambio de tarea [5]. De igual manera, al bloquear la subunidad GluN2B del NMDAR disminuía la capacidad de las ratas para suprimir la

respuesta previa y buscar otra alternativa, ya que presentaban un mayor número de perseveraciones [54].

Estudios realizados en ratas en distintas etapas del desarrollo (6, 13 y 24 meses de edad) han mostrado que la flexibilidad cognitiva va disminuyendo paulatinamente con relación a la edad [10,52], fenómeno que también ocurre en los primates durante el envejecimiento. Esta disminución también se ha observado al comprar monos de diferentes edades [70].

3.4. Atención

La atención se define como la capacidad del individuo que le permite enfocarse y registrar la información específica obtenida de un ambiente externo o interno [19]. Rushworth y cols., realizaron estudios de Resonancia Magnética Funcional en sujetos de 20 a 48 años mientras realizaban pruebas de atención, encontraron que las áreas que registraban mayor actividad al realizar estas tareas eran las áreas corticales del giro cingulado anterior derecho, la corteza parietal posterior derecha, la corteza bilateral frontal premotora y frontal medial, el surco temporal superior derecho, y activación subcortical en el tálamo.

Estudios realizados para analizar el desempeño de las ratas en tareas de atención en distintas etapas del desarrollo han mostrado que existe una disminución progresiva de este proceso que inicia en la edad media de la rata (14 meses) [9,59] y se incrementa durante el envejecimiento [52]. En este sentido, en un estudio realizado por Beas y cols., se compararon ratas jóvenes (6 meses) con viejas (24 meses) y se observó que estas últimas cometían un mayor número de errores que las ratas jóvenes en una tarea de atención [52]. De igual manera, Guidi y colaboradores en el 2015, observaron que la atención en ratas de mediana edad (14 meses), era significativamente menor que las ratas jóvenes (6 meses). Al igual que otras funciones cognitivas, los NMDAR juegan un papel importante mediando los procesos de atención [9,60]. En este sentido, Guidi y cols., observaron que, la administración de un antagonista de los NMDAR a ratas de edad media disminuía

su desempeño en pruebas de atención [9]. Tomados en conjuntos, estos antecedentes sugieren que el desempeño en la atención va disminuyendo conforme avanza la edad.

3.5. D-serina y su papel como co-agonista de los NMDAR

Por muchos años, la glicina fue considerada como el co-agonista endógeno de los NMDAR en el cerebro. Sin embargo, a mediados de la década de los 90s, se observó la alta afinidad de la D-serina por los sitios de unión de glicina y su gran capacidad para activar los NMDAR en la corteza frontal de ratas, hecho que constituyó el primer indicio de que este aminoácido era un co-agonista de los NMDAR [45]. Ahora es claro que la D-serina y no la glicina, es el principal co-agonista endógeno de los NMDAR [12,13,68]. Esto se basa en diversas evidencias como, por ejemplo: i) La alta capacidad de la D-serina para activar los NMDAR [45]. ii) La expresión de D-serina coincide con la expresión del NMDAR [38]. iii) La expresión de la D-serina y los NMDAR co-varian en diferentes etapas del desarrollo [12,13].

3.6. Metabolismo de la D-serina

La D-serina es sintetizada a partir de la L-serina por la acción de la enzima Serina racemasa (SR) [73,74]. En el cerebro, la expresión de la SR se ha observado principalmente en los astrocitos [37], aunque se encuentra también en las neuronas [62] y en la microglia [57]. La D-serina es liberada por los astrocitos y las neuronas por distintos mecanismos, mientras que los astrocitos se libera bien como un proceso de exocitosis, o a través del transportador alanina-serina-cisteina (ASCT) y por canales regulados por volumen de aniones (VRAC). Por su parte, las neuronas liberan D-serina en respuesta a una despolarización [37] con ayuda del transportador de alanina-serina-cisteina independiente de Na⁺ (ASC1) [44].

La degradación de la D-serina se lleva a cabo principalmente por la acción de la enzima D-amino ácido oxidasa (DAAO) localizada en el SNC en el tronco encefálico [66] y en el cerebelo [66,67]. Además de la degradación a nivel central, la D-serina es transportada fuera del cerebro, a la sangre y de ahí hacia el riñón en donde es degradada con ayuda de la misma enzima [75].

Aunque la D-serina es sintetizada endógenamente, al igual que otros aminoácidos, se absorbe en el lumen intestinal cuando se ingiere. Esto debido a que las células epiteliales expresan los transportadores de aminoácidos $ATB^{0,+}$ [40]. Una vez reconocida por estos transportadores, la D-serina se introduce a las células epiteliales y es vertida a la sangre con ayuda del transportador ASC1 [40] (Fig. 3). De manera interesante, la D-serina exógena puede atravesar la barrera hematoencefálica utilizando transportadores de diferente afinidad, como son el ASC1 y SLC7A10, de mayor afinidad, así como el ASCT2 y SLC1AS de menor afinidad [24]. A pesar de que no existen estudios detallados de la relación entre los niveles séricos de D-serina y los niveles centrales, Guercio y cols., observaron que la administración intraperitoneal de D-serina en ratas (1g/kg de peso), producía un aumento de los niveles intracerebrales de D-serina. Este incremento alcanzó su máximo entre los 20 y los 40 min y se mantuvo elevado por al menos 4 horas posteriores a su administración [30].

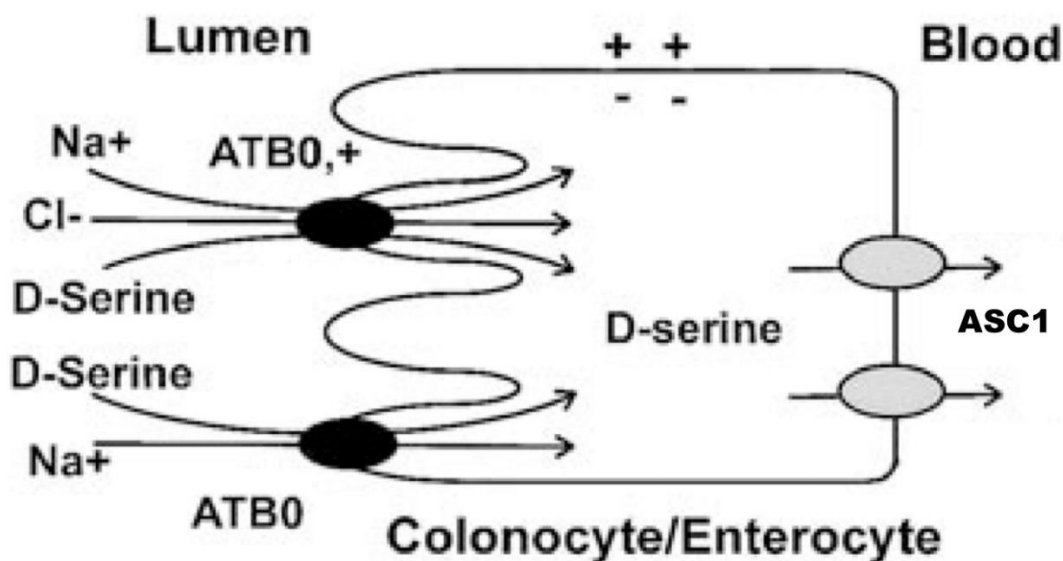


Fig. 3 Las células del intestino expresan transportadores para D-serina. La D-serina que se

encuentra en el lumen intestinal entra a las células intestinales a través del transportador ATB⁰. Posteriormente es captada por el transportador ASC1 el cual se encarga de pasarla a la sangre. Tomado de Takahiro Hatanaka et al., 2002.

3.7. Liberación de D-serina en diferentes etapas del desarrollo.

Las concentraciones intracerebrales de D-serina cambian dependiendo de la estructura cerebral que la contenga [71,72]. En este sentido, Miyoshi y cols., en el 2011 reportaron que los niveles intracerebrales de D-serina en ratas en corteza cerebral e hipocampo oscilaban entre 250 y 350 nmol/g respectivamente, mientras que en el hipotálamo y bulbo olfatorio era de 80 y 200 nmol/g respectivamente. Además de las diferencias entre estructuras cerebrales, los niveles de D-serina también cambian dependiendo de la etapa de desarrollo en el que se encuentren los organismos. Así, Hashimoto y cols., midieron los niveles intracerebrales de D-serina en ratas, y observaron que estos alcanzan su máximo entre los 20 y los 40 días postnatales y a partir de ahí disminuyen gradualmente con la edad [12]. Sin embargo, estudios en rebanadas de hipocampo así como estudios conductuales en ratas jóvenes (2-4 meses de edad), han mostrado que la administración exógena de D-serina no modifica las respuestas sinápticas mediados por NMDAR [11] lo que sugiere que los niveles de D-serina en condiciones fisiológicas son tales que los sitios de unión en los NMDAR se encuentran saturados [11].

3.8. Efecto de la D-serina en los procesos cognitivos en ratas y humanos

Debido a que la D-serina es el principal co-agonista endógeno de los NMDAR y este receptor juega un papel importante en las funciones cognitivas, no es de sorprender la participación de la D-serina en funciones cognitivas. De acuerdo con esto, al bloqueo del sitio de unión a D-serina en los NMDAR, disminuye el aprendizaje en ratas jóvenes [69]. De igual manera, la administración exógena de D-serina facilita la memoria espacial en una prueba en el laberinto acuático de Morris [34] y la memoria a largo plazo en una tarea de evitación inhibitoria [11].

El papel de la D-serina en las funciones cognitivas ha sido también evaluado en humanos, de modo que, la D-serina se ha convertido en un fármaco de suma importancia en diversas patologías en las que existe un mal funcionamiento del NMDAR. Tal es el caso de la esquizofrenia, en donde se ha visto que hay una mejoría del déficit cognitivo [23] y de los síntomas negativos [31,32]. Así mismo, se ha utilizado en pacientes que padecen depresión y ansiedad, en donde, la administración oral de D-serina mejora el desempeño cognitivo de los pacientes [33]. Basándonos en estos datos obtenidos de las condiciones patológicas, cabe la posibilidad que la D-serina pudiera mejorar el desempeño cognitivo disminuido asociado a condiciones no patológicas como el envejecimiento.

3.9. D-serina y envejecimiento

Existen indicios sugerentes del papel de la D-serina en modelos animales de envejecimiento. Se ha documentado que, los niveles de D-serina en roedores viejos se encuentran disminuidos en comparación con roedores jóvenes [13,27,28], lo que produce un malfuncionamiento de los NMDAR [13,27]. Uno de los factores que explica esto es la disminución de la expresión de la SR [76]. En paralelo, durante el envejecimiento se ha reportado una hipofunción de los NMDAR [69] lo que se refleja en una disminución en las respuestas sinápticas mediadas por NMDAR, la disminución en la plasticidad (LTP) [29] y en las funciones ejecutivas tales como la atención y la flexibilidad cognitiva [9,42]. Es así que, la deficiencia de D-serina podría estar relacionada con la disminución en las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento. En este sentido, el presente proyecto pretende estudiar el papel de la D-serina en el inicio y progreso del deterioro de la flexibilidad cognitiva y la atención que ocurren durante el proceso del envejecimiento.

4. JUSTIFICACIÓN

La población mundial está envejeciendo a pasos acelerados. Según la OMS (Organización mundial de la salud) entre el 2015 y el 2050, la proporción de la población mundial con más de 60 años pasará de 900 a 2000 millones, lo que representa un aumento del más del 200% [15]. En particular, Latino América será la región que más envejecerá en los próximos 50 años pasando de 400 millones en el 2000 a 1,7 billones en el 2050, observando un aumento de un 425% [15]. En México, en el 2010 cerca del 9% de la población tenía más de 60 años. Sin embargo, se estima que para el 2030 el porcentaje ascenderá a 17% y para el 2050 conformarán más del 25% de la población (Secretaría de salud, 2010), es decir, en tan solo 34 años, 1 de cada 4 mexicanos tendrá más de 60 años.

A medida que las personas envejecen, existe un deterioro progresivo de las funciones cognitivas. Los signos tempranos de este deterioro incluyen una disminución en el aprendizaje, la memoria, la atención y la flexibilidad cognitiva entre otros [19,50]. En México, se estima que cerca del 30% de los adultos de más de 65 años presentan alguna discapacidad por deterioro cognitivo o motor lo que conlleva a problemas sociales y económicos (Secretaría de salud, 2010).

La población de la tercera edad (mayor de 60 años) en México, se mantendrá en continuo crecimiento, aumentando 76.3% del año 2000 al 2015 y 63.2 % en los últimos dos decenios. En este sentido, es claro que conocer los mecanismos celulares que llevan al declive cognitivo permitirá desarrollar herramientas y estrategias que nos permitan retardar, disminuir e incluso prevenir el deterioro, lo que mejorará la calidad de vida de las personas.

5. HIPÓTESIS

La administración oral de D-serina disminuirá el deterioro de la flexibilidad cognitiva y la atención asociado al envejecimiento en ratas.

6. OBJETIVO GENERAL

Conocer el papel de la administración oral de D-serina en el deterioro de la flexibilidad cognitiva y la atención asociado al envejecimiento en ratas.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la flexibilidad cognitiva y la atención en ratas de 6,12 y 18 meses de edad.
2. Observar el efecto de la administración oral de D-serina sobre el deterioro en la flexibilidad cognitiva y la atención en ratas de 18 meses de edad.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo experimental longitudinal prospectivo.

8.2. Definición del universo

Se incluyeron ratas macho de la cepa *Wistar* de 6, 12 y 18 meses de edad del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla.

8.3. Tamaño de la muestra

Se utilizaron 12 ratas por grupo experimental (72 ratas en total en el estudio). Las ratas se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla las cuales fueron divididas de manera aleatoria en los grupos de estudio.

8.4. Definición de las variables

- Variables dependientes:
 - Edad
 - Flexibilidad cognitiva
 - Atención
 - Actividad locomotora
- Variables independientes:
 - D-serina

8.5. Definición del grupo de comparación

El grupo control estuvo constituido por ratas macho que cumplieron con las mismas especificaciones (edad, sexo, alimentación) y que realizaron el mismo entrenamiento en las tareas conductuales que las ratas tratadas con D-serina

8.6. Definición del grupo a intervenir

Ratas macho de la cepa Wistar de 12 y 18 meses de edad.

8.7. Criterios de inclusión

1. Ratas de la cepa Wistar.

2. Ratas de sexo masculino.
3. Ratas entro 6 y 18 meses de edad.
4. Ratas sanas

8.8. Criterios de eliminación

1. Ratas que se enfermaron durante el estudio.
2. Ratas que no lograron aprender la tarea inicial.
3. Ratas que murieron durante el estudio.

8.9. Definición de variables y unidades de medida

Variable	Descripción conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala	Unidad de medida
Edad	Tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento del animal	Meses desde su nacimiento	Cuantitativa	0-18	Meses
Flexibilidad cognitiva	La habilidad de un animal de adaptar las estrategias previamente aprendidas para enfrentar nuevas experiencias	Se refiere al número de errores que las ratas presentan cuando se les cambia la palanca que deben de presionar para obtener su recompensa.	Cuantitativa	0-120	Errores
Atención	Capacidad del individuo que le permite enfocarse y registrar la información específica	Es el número de veces que la rata presiona la palanca ipsilateral al	Cuantitativa	0-120	Aciertos

	obtenida de un ambiente externo o interno	estímulo luminoso			
D-serina	Aminoácido no esencial, que se obtiene a partir de la catalización de L-serina	Se evaluarán las diferencias entre el grupo control y el grupo que se le administrara D-serina.	Cuantitativa	30 300	mg/kg de peso

8.10. Metodología

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con las normas y lineamientos éticos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y del NIH “Guide for the Care and Use of Experimental Animals” y fueron sometidos a evaluación ante el Comité de Bioética de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

8.11. Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 6, 12, y 18 meses de edad, obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM *campus* Juriquilla. Las ratas fueron alojadas individualmente en un ambiente con temperatura y humedad controlada con ciclos de luz y oscuridad (12/12) y agua *ad libitum*. Las ratas se mantuvieron con alimento restringido al 85% de su peso.

8.12. Droga

Se administro D-serina, de manera oral a dosis de 30 mg/kg de peso o 300 mg/kg de peso, en el agua de beber. La D-serina se obtuvo de Sigma-Aldrich Co. Ltd.

8.13. Toxicidad de la D-serina

La D-serina es una sustancia endógena, que en ratas jóvenes se encuentra en altas concentraciones. El diseño de los experimentos de este trabajo, están encaminados en suplementar la D-serina para normalizar sus niveles y de esta manera normalizar la función cerebral. Además, estudios en los que se ha administrado D-serina exógena, tanto en ratas de laboratorio [26,30,33], como en humanos [31,32], no han reportado que esta cause toxicidad, por lo que no se tomaron medidas especiales para la suplementación de este aminoácido.

8.14. Experiencia de los investigadores en el manejo de animales

En el laboratorio en el que se llevaran a cabo los experimentos, se tiene experiencia en el manejo de diferentes animales (ratón, rata y hurón). Todos los participantes de este trabajo fueron debidamente certificados para el manejo de animales por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

8.15. Equipo

Se realizaron pruebas de evaluación de la flexibilidad cognitiva y de atención en ratas de 6, 12 y 18 meses. Para esto, se utilizaron cajas de condicionamiento operante, las cuales contaron con dos palancas retractiles, 2 luces para el estímulo visual y un dispensador de comida que fue utilizado como recompensa. El diseño y control de las tareas, así como la adquisición de las respuestas se hizo a través de Arduino y Visual Basic.

8.16. Entrenamiento

El entrenamiento de las ratas se dio por aproximaciones sucesivas en sesiones de no más de 30 min de duración. El entrenamiento de las ratas se completó entre 30-35 días y se dividió en 3 fases, como sigue:

Fase 1: Esta fase tiene como objetivo enseñar a la rata a asociar el palanqueo con el reforzador (comida). Para esto, se colocaron a las ratas en la caja de condicionamiento operante por 30 min, en donde las palancas permanecían extendidas todo el tiempo y se reforzaba la presión de cualquiera de las 2 palancas. Se determinó que la rata había concluido esta fase, cuando alcanzo una eficiencia de 50 palanqueos consecutivos (Fig.4).



Fig. 4. Esquema que ejemplifica la Fase 1 del entrenamiento. En esta fase, la rata aprendía que la presión de las palancas (sin importar la lateralidad), le daba una recompensa (croqueta de comida).

Fase 2: Durante esta fase, la rata aprendió a presionar la palanca en respuesta a un estímulo visual. Para esto, la recompensa se dio únicamente cuando la rata presiono la palanca ipsilateral al estímulo luminoso (Fig.5).



Fig. 5. Esquema que ejemplifica la Fase 2 del entrenamiento. En esta fase, la rata solo recibió recompensa (croqueta de comida), si presionaba la palanca ipsilateral a la luz

8.17. Prueba de evaluación de la flexibilidad cognitiva

Una vez que las ratas habían aprendido a presionar la palanca ipsilateral al estímulo luminoso para obtener la recompensa, la regla cambió. En esta fase, la rata ya no recibía recompensa al tocar la palanca ipsilateral al estímulo luminoso, ahora para recibirla debía tocar la palanca contralateral al estímulo luminoso. Se cuantifico el número de errores como el número de veces que la rata presionaba la palanca ipsilateral. El grado de flexibilidad cognitiva se relaciona de manera inversa al número de errores, es decir entre menos flexibilidad cognitiva tenga una rata, mayor será el número de errores que esta realice.

8.18. Prueba de evaluación de Atención

Posterior a la evaluación de la flexibilidad cognitiva, las ratas fueron reentrenadas en fase 2 por 3 días y se evaluó la atención al cuarto día. Para esto, se presentó el estímulo visual con duraciones que oscilaron (de manera aleatoria) entre 0.5, 2.5 y 10 s. Posterior al estímulo visual, las palancas se extendieron permitiéndole a la rata presionar las palancas. Si la palanca presionada era la ipsilateral a la luz, entonces la rata recibía una recompensa.

8.19. Análisis del efecto de la administración oral de D-serina sobre el deterioro en la Flexibilidad cognitiva y la Atención

Con el fin de analizar el efecto de la D-serina sobre el deterioro de la flexibilidad cognitiva y la Atención, las ratas de 12 meses, las cuales habían ya sido evaluadas en tareas de Flexibilidad cognitiva y atención (procedimiento previamente descrito), se mantuvieron para llevar a cabo un análisis longitudinal y ser evaluadas a los 18 meses. Para esto, las ratas continuaron alojadas individualmente en un ambiente con temperatura y humedad controlada con ciclos de luz y oscuridad (12/12), con comida y agua *ad libitum*. Se dejaron envejecer hasta los 16 meses de edad y se inició la administración oral de D-serina (diluido en el agua de beber) por 2 meses, es decir, hasta que las ratas cumplieron los 18 meses de edad. Las ratas que recibieron D-serina se dividieron en 2 grupos, los que reciban la dosis de 30mg/kg de peso (18 meses + 30 mg) y las que reciban 300 mg/kg de peso (18 meses + 300 mg), a la par, contamos con un grupo control las cuales fueron mantenidas en las mismas condiciones que las ratas tratadas, solo que estas recibieron en lugar de la D-serina, únicamente agua (18 meses + agua). Además, contamos con un grupo de 18 meses de edad que no había sido previamente evaluado (18 meses). Tanto los grupos de intervención como los controles tuvieron las mismas características, se mantuvieron en iguales condiciones y realizaron las mismas evaluaciones.

8.20. Eutanasia

Una vez terminada las evaluaciones en los animales de estudio, fueron regresados al Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla, donde, personal capacitado les realizo la eutanasia, por inhalación de CO₂, siguiendo los siguientes pasos:

1. Colocar los animales en la caja en cantidades tales que ocupen la mayor superficie del piso posible (no amontonados).

2. Colocar la tapa filtro de la caja.
3. Abrir el flujo de CO₂ durante aproximadamente 3 minutos verificando que la presión del flujo de salida del gas no cause tanto ruido para que no se estresen los animales. Cuando los animales estén inconscientes e inmóviles, dejar por otros 3 minutos para que mueran. Constatar la muerte por ausencia de latido cardiaco.
4. Constatada la muerte de los animales, se depositaron en una bolsa amarilla según NOM-087-ECOL-1995.
5. Lavar y desinfectar el área utilizada, colocando los materiales y equipos en su lugar asignado.
6. Una vez terminado este procedimiento, depositar los implementos de bioseguridad en el envase indicado (bolsa roja).

8.21. Diseño experimental

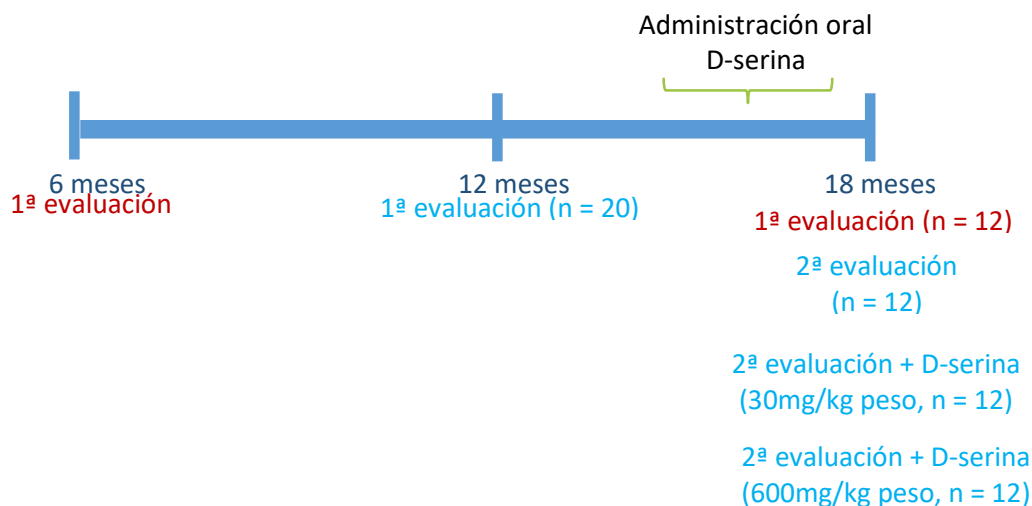


Fig. 6 Diseño experimental en el que se representan los grupos con los que se trabajará y las intervenciones a cada grupo. Color rojo: grupos con una evaluación independientes. Color celeste: primer grupo de intervención.

8.22. Prueba piloto

Se realizó una prueba piloto utilizando ratas macho de la cepa *Wistar* de 2 a 3 meses de edad las cuales fueron alojadas, manipuladas, entrenadas y evaluadas en iguales condiciones con los grupos experimentales.

8.23. Definición del plan de procesamiento y presentación de la información

Con la información obtenida, se realizó análisis de las variables en el programa SigmaPlot y MATLAB en el que se correlacionaran cada una de las variables. Se realizó así mismo, análisis estadístico con ANOVA paramétrica y una prueba de U de Mann-Whitney para los datos no paramétricos.

Los resultados se presentan en gráficos y tablas confeccionados con el propio programa Sigma Plot y MatLab

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizamos ratas de diferentes edades (6, 12 y 18 meses de edad) con el fin de analizar el cambio en las funciones cognitivas que ocurre como un proceso natural durante el envejecimiento y como esto se modifica por la administración de D-serina. Las ratas se entrenaron en diferentes sesiones en cajas de condicionamiento operante en tareas que evaluaban ya sea la flexibilidad cognitiva o la atención.

9.1. Adquisición de la tarea

El progreso en el desempeño de las ratas de 6, 12 y 18 meses (número de aciertos correctos) en las diferentes sesiones de entrenamiento (curvas de la adquisición de la tarea) se muestra en la figura 1. El número de aciertos (presión de la palanca ipsilateral a la luz) realizados por los tres grupos de ratas en las diferentes sesiones fueron comparables. Estas respuestas incrementaron progresivamente durante las sesiones, alcanzando el nivel de significancia del 80% en la sesión 8 y una meseta alrededor de la sesión 13 (Fig. 1A, C). El máximo desempeño se obtiene con un total de ~ 90 aciertos (Fig. 1A) lo que equivalen a un 80% de palanqueos correctos (Fig. 1C). Por el contrario, el número de errores (presión de la palanca contralateral a la luz), fueron disminuyendo a partir de la sesión 6 alcanzando un valor mínimo estable a partir de la sesión 13, presentando al final de la fase un promedio de errores menor a 30 equivalente a 25% (Fig.1B). Al igual con las curvas de adquisición, no se observaron diferencias en las ratas de diferentes edades (Fig. 1D). Estos resultados son esperados debido a que es una tarea sencilla (presionar la palanca ipsilateral a la luz) y concuerda con estudios previos realizados, como el de Beas y cols., [52] en el que compararon ratas de 6 y 22 meses de edad y ambos grupos necesitaban el mismo número de sesiones para alcanzar los criterios requeridos para ser evaluadas.

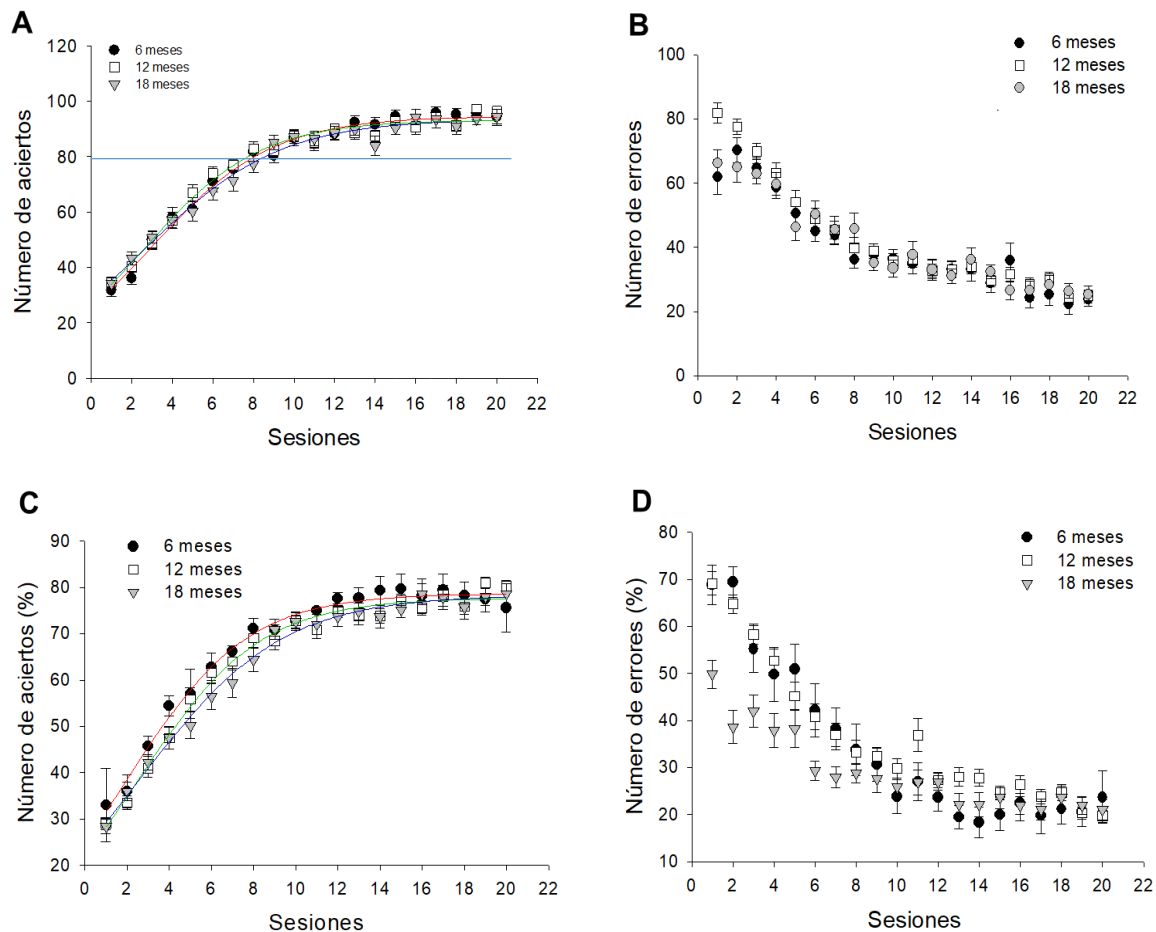


Figura 1. Curvas de adquisición de la tarea de las ratas de 6,12 y 18 meses entrenadas en una tarea de palanqueo. Las ratas (6 meses n=20, 12 meses n=39, 18 meses n=24) fueron entrenadas para presionar la palanca ipsilateral a la luz (número de aciertos). El total del número de aciertos aumentan con el número de sesiones (A), mientras que el número de errores (presión de la palanca contralateral a la luz), disminuyen en cada sesión (B). C, El porcentaje de palanqueos correctos (palanqueos correctos/palanqueos totales) aumentan progresivamente, mientras que el porcentaje de errores (presión de la palanca contralateral/totales) disminuyen (D). La línea punteada representa el nivel de significancia del 95%. Los datos en los paneles A y C se ajustaron a una función sigmoidea.

9.3. Caracterización de flexibilidad cognitiva en ratas de 6, 12 y 18 meses

Una vez alcanzado el máximo de la efectividad en la tarea (Figura 1A, C), se realizó la evaluación de la flexibilidad cognitiva. Para esto, a diferencia de la tarea anterior, en esta tarea, la presión de la palanca ipsilateral no daba el reforzador. Para obtenerlo, la rata tenía ahora que presionar la palanca contralateral. Así, como medida de la flexibilidad cognitiva, se contabilizó el número de veces que la rata

presionaba la palanca ipsilateral a la luz (número de perseveraciones). Así, a mayor número de perseveraciones, menor flexibilidad cognitiva. Durante la sesión de evaluación (30 min), se contabilizó el número de perseveraciones que realizaban las ratas en intervalos de tiempo de 5 minutos, encontrando que la disminución en el número de perseveraciones empezaba a disminuir a partir de los 10 minutos, este comportamiento fue similar en los tres grupos de edad (6, 12 y 18 meses de edad) (Fig. 2A). Estos datos sugieren que es durante estos primeros minutos que las ratas se dan cuenta que la regla para obtener el reforzador ha cambiado, por lo que decidimos tomar como perseveraciones, las presiones de la palanca ipsilateral posterior a los 10 min de inicio de la sesión. El análisis del número de perseveraciones por rata por grupo de edad se muestra en el panel 2B en donde se indica, como referencia, los percentiles (25 y 95), según el número de perseveraciones de las ratas de 6 meses. Por debajo del percentil 25 (línea azul) representa un menor número de perseveraciones y por lo tanto un desempeño superior. Por encima del percentil 95 (línea roja) se encuentran las ratas que realizaron un mayor número de perseveraciones por lo que se consideran con desempeño inferior en la tarea de flexibilidad. Las ratas cuyo desempeño se localizaba entre el 25 y el 75% (entre la línea azul y roja) mostraban entonces un desempeño normal. En los grupos de ratas de 6, 12 y 18 meses se observó un aumento progresivo en el número de perseveraciones, siendo máximo en el grupo de 18 meses (Fig. 2B).

Se cuantificó la proporción de ratas según su desempeño (superior-parte azul de la barra; promedio, verde; e inferior, amarilla) y con base en los percentiles que se obtuvieron para las ratas de 6 meses (Fig. 2C). Al analizar el desempeño de las ratas de 6, 12 y 18 meses de edad se observó que hay una disminución progresiva de la flexibilidad cognitiva de las ratas de 12 y 18 meses en comparación con las ratas de 6 meses. Esta tendencia a la disminución de la flexibilidad cognitiva con respecto a la edad, también se ha observado en estudios previos realizados en ratas, monos y humanos de diferentes edades en los cuales se ha estudiado el cambio en la flexibilidad cognitiva asociado a la edad. En este sentido, Beas y cols., [52] compararon ratas de 5 meses con ratas de 22 meses, encontrando una

disminución en el desempeño de la flexibilidad cognitiva en las ratas viejas comparadas con las jóvenes.

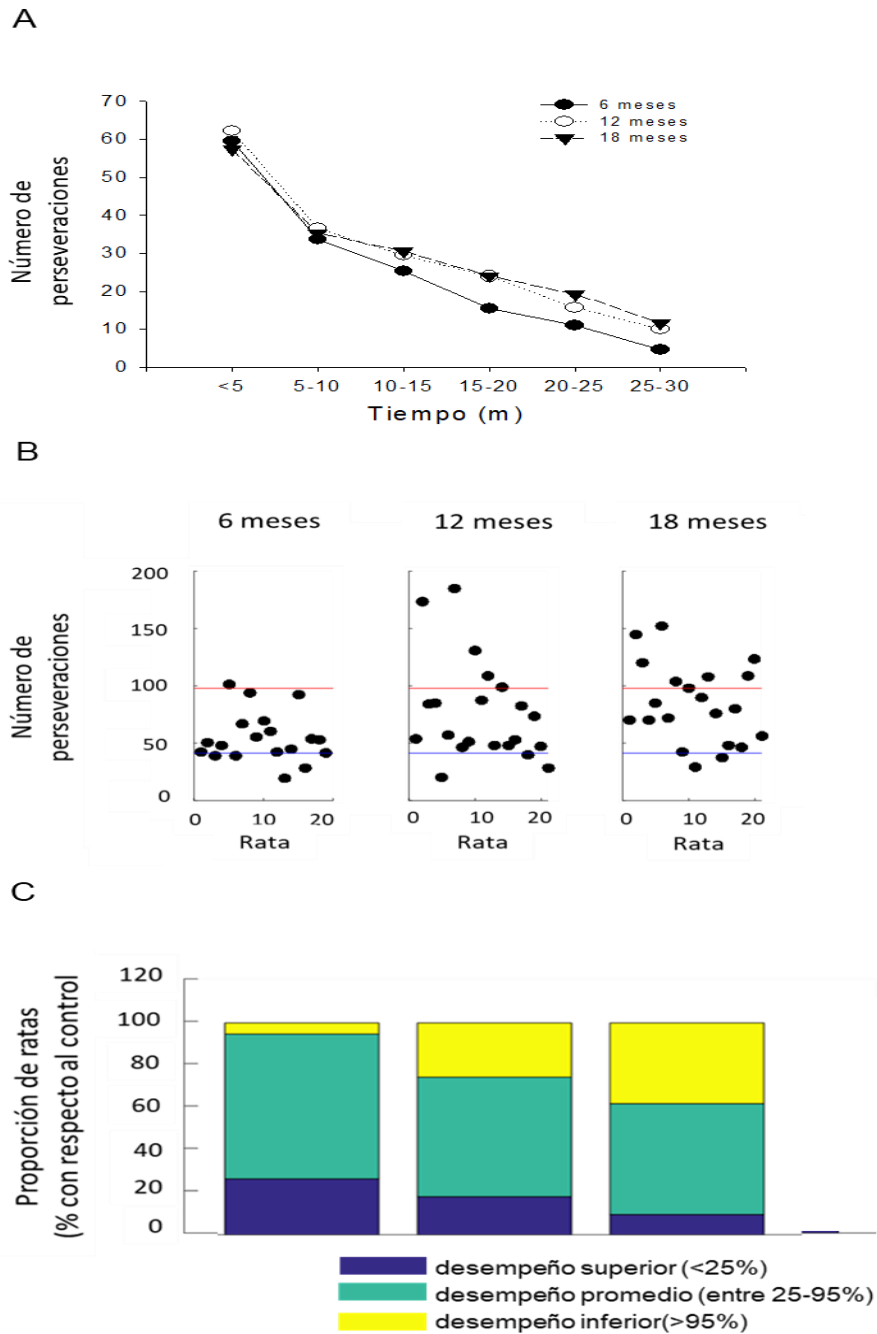


Figura 2. Evaluación de la flexibilidad cognitiva de las ratas de 6, 12 y 18 meses. A, Número de perseveraciones a través de la sesión **B,** Distribución en percentiles del número de perseveraciones (palanqueos ipsilaterales) de las ratas de 6, 12 y 18 meses **C,** proporción de ratas según su desempeño.

9.3. Caracterización de la atención en ratas de 6, 12 y 18 meses

Los resultados obtenidos en las pruebas de atención por las ratas de 6, 12 y 18 meses se muestran en la figura 3. Para la evaluación de la atención, se utilizó el protocolo de entrenamiento mostrado en la figura 1, es decir, en respuesta a la presión de la palanca ipsilateral, la rata obtenía una recompensa. Con el fin de evaluar la atención, la duración del estímulo luminoso se varió de manera aleatoria entre los valores de 10, 2.5 y 0.5 s y se analizó el número de respuestas correctas (palanqueos ipsilateral a la luz). Como primera aproximación, se analizaron el número total de aciertos total, que corresponde a la suma de los aciertos de cada una de las duraciones de los estímulos luminosos. Al igual que con la flexibilidad cognitiva, se calcularon los percentiles 25 (línea azul) y 75 (línea roja) y se cuantificó la distribución del desempeño de las ratas por debajo o arriba de estos percentiles. Como era de esperarse, el mayor número de ratas de 6 meses (50%) realizaban un número de aciertos entre el percentil 25 y 75 (desempeño promedio) (Figura **3B**), mientras que el resto de este grupo realizaba un número de aciertos por debajo del percentil 25 (desempeño inferior) y por arriba del 75 (desempeño superior). En las ratas de 12 meses se observó un aumento en el porcentaje de ratas que realizaban un desempeño inferior en comparación con las ratas de 6 meses. Las ratas de 18 meses siguieron este mismo patrón, aumentando el número de ratas que mostraron un desempeño inferior, no encontrándose en este grupo ningún sujeto por encima del percentil 75 (Fig. **3A** y **3B**).

Con el fin de analizar el desempeño en la atención con mayor detalle, se analizaron los números de aciertos de acuerdo con la duración del estímulo luminoso (10 s, 2.5 s y 0.5 s). La cuantificación de la proporción de ratas según su desempeño se muestra en la figura 5. Aunque la tendencia a mostrar un menor desempeño en las ratas de 18 meses se observa en los 3 tiempos, esta diferencia es más evidente en el tiempo de 2.5 s, en comparación con 5 y 10 s (Fig **5A-C**).

El desempeño en tareas de atención disminuye con respecto a la edad, esto ha sido demostrado por grupos como el de Guidi y cols., [9,69] que analizaron el

desempeño de ratas jóvenes y de mediana edad en pruebas de atención, encontrando que estas últimas realizaban un mayor número de errores en comparación con las ratas jóvenes. En los resultados de atención obtenidos en el presente estudio se puede observar una disminución progresiva asociada a la edad, tanto para el número de aciertos totales, como para cada una de las duraciones de estímulo (Fig. 4 y 5). Esta diferencia es más evidente en el tiempo de 2.5 s, debido probablemente a la dificultad para resolver la tarea siendo un reto mayor para las ratas viejas el menor tiempo de duración del estímulo (Fig. 5A-C)

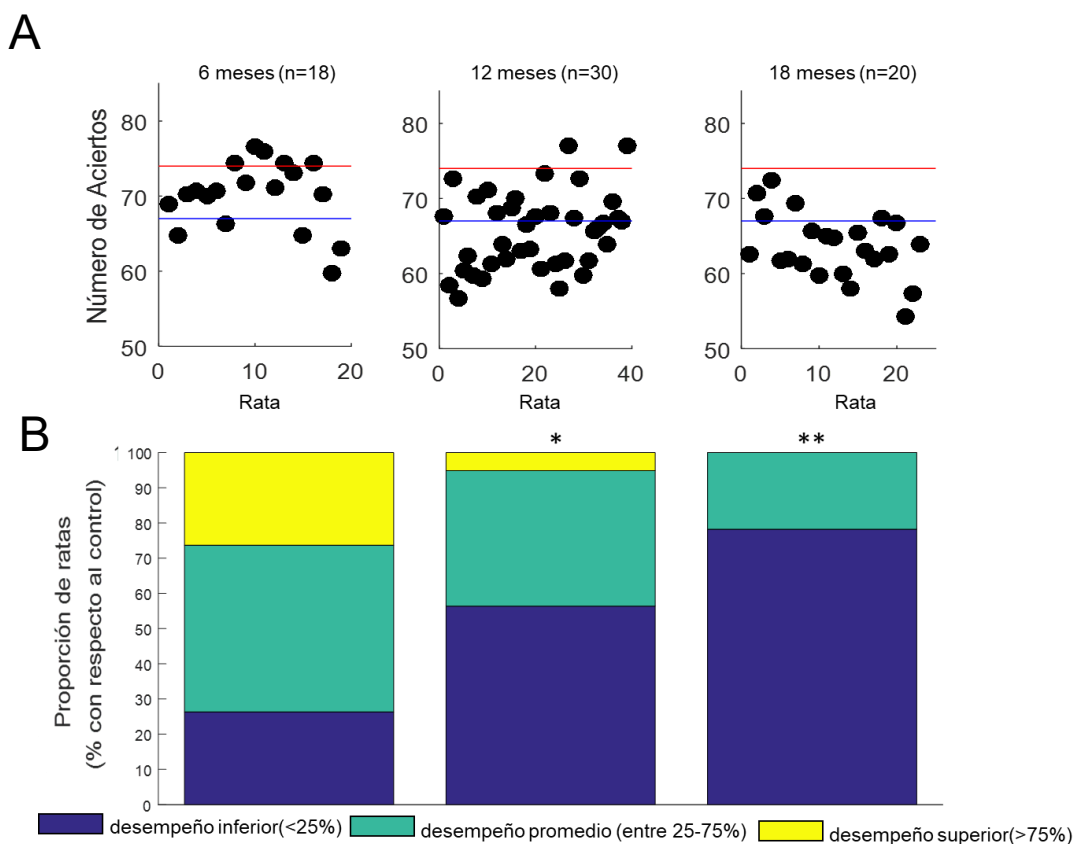
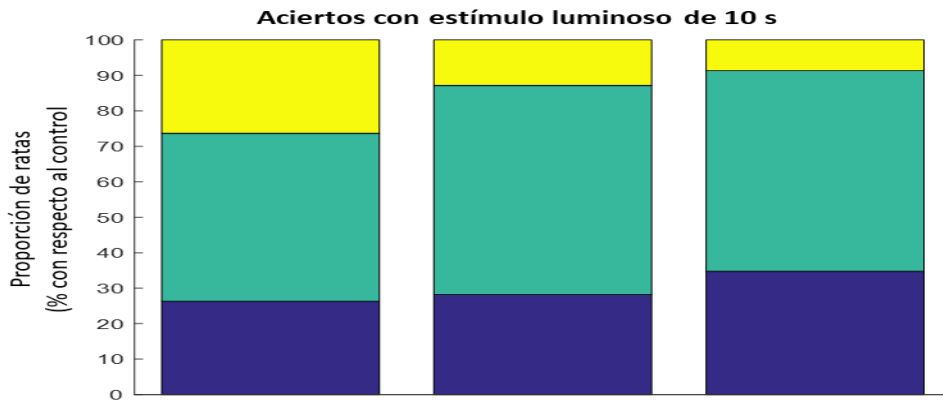
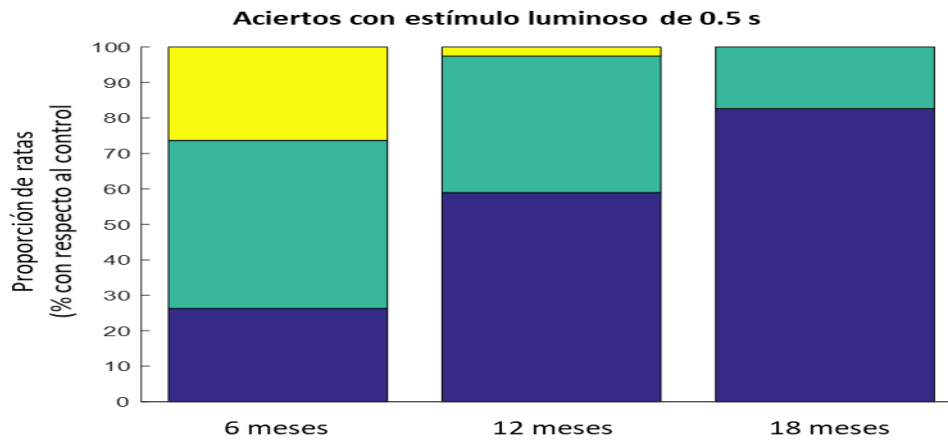
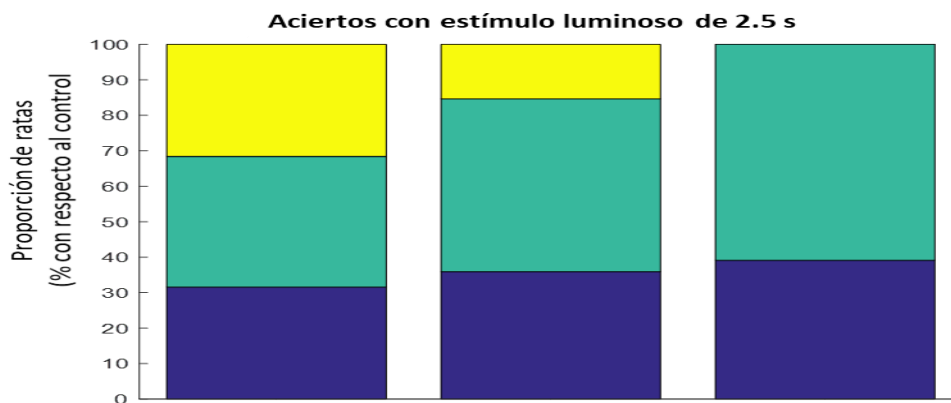


Figura 3. Evaluación de la atención de las ratas de 6, 12 y 18 meses. Las ratas fueron evaluadas contabilizando el número de aciertos (presión de la palanca ipsilateral a la luz). **A**, total del número de aciertos obtenidos con diferentes duraciones del estímulo luminoso (sumatoria de aciertos de: 10, 2.5, 0.5 s. **B**, Proporción de ratas según su desempeño en la prueba de atención. U de Mann-Whitney * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$.

A



B



■ desempeño inferior (<25%)
■ desempeño promedio (entre 25-75%)
■ desempeño superior (>95%)

Figura 4. Proporción de ratas según su desempeño en la prueba de atención, con diferentes duraciones del estímulo luminoso (10 s, 2.5 s, 0.5 s) en ratas de 6, 12 y 18 meses

9.4. Caracterización de la actividad locomotora en ratas de 6, 12 y 18 meses

Los resultados obtenidos en la actividad locomotora de las ratas de 6, 12 y 18 meses se muestran en la figura 4. Para esta prueba las ratas fueron colocadas en cajas individuales, que contaban con una rueda en la cual las ratas podían correr de manera voluntaria. Se contabilizó la distancia que recorrían cada hora por 3 días (Fig. 4A). Se consideró el primer día como parte de la adaptación de la rata a la caja así que para su posterior análisis se analizó la distancia total promedio que recorrieron las ratas durante los dos últimos días. Los resultados muestran que las ratas de 6 meses recorrieron una mayor distancia significativa con un promedio de 488.47m, en comparación con las de 12 meses con un promedio de 335.03m y 357.05 metros en las de 18 meses. (Fig. 5B; $p < 0.05$ U-Mann Whitney). Esta disminución en la actividad locomotora se ha reportado con anterioridad, tanto en animales de laboratorio como en humanos, que el aumento de la edad es inversamente proporcional a la actividad física, es decir, a mayor edad menor actividad física [81,82]. Esta disminución podría estar asociada tanto a factores periféricos, como puede ser la disminución de la masa muscular, como a factores centrales, tales como la alteración en el sistema cerebral de la recompensa que se dan en el envejecimiento [80]. Se puede observar que hay un comportamiento similar al desempeño en funciones cognitivas, esto es de esperarse ya que se ha visto que la disminución de la actividad física tiene un efecto negativo sobre estas [83,84] Esta afectación podría deberse a la disminución de los niveles de proteínas, por la pérdida de masa muscular. En este sentido, se ha observado que el ejercicio físico cambia los niveles de proteínas sinápticas como la sinapsina y la sinaptofisina, proteínas involucradas en la liberación de neurotransmisores [88]. De igual manera, el ejercicio voluntario se ha visto asociado a un aumento de la LTP, en dependencia de la activación de los NMDAR [86].

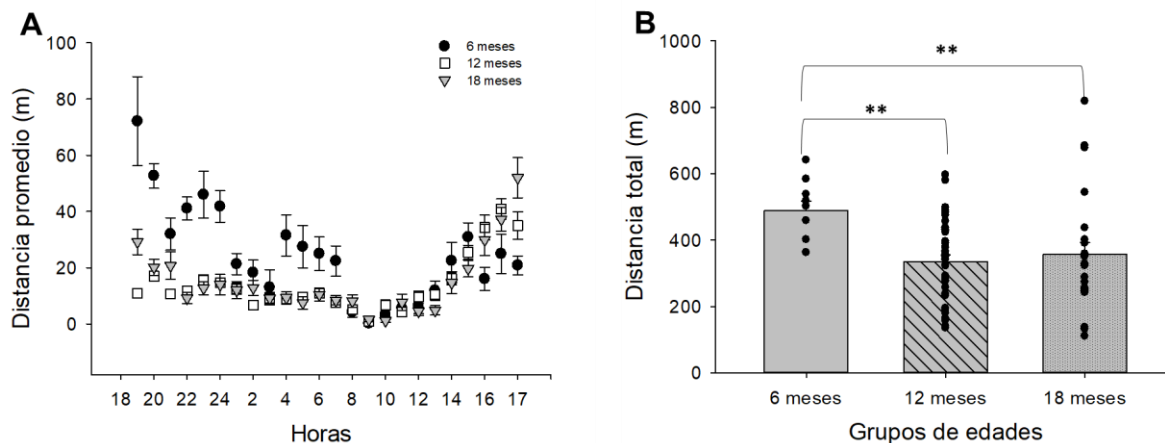


Figura 5. Evaluación de la actividad locomotora voluntaria de las ratas de 6,12 Y 18 meses. La distancia que recorren las ratas en cajas individuales se contabilizo cada hora en la rueda (A). comparación del promedio y el EE de la distancia total recorrida por cada grupo de ratas, y se muestra en círculos negros la distancia promedio recorrida por cada rata (B). $F=4.80$, $**p<0.01$, ANOVA

Una de las causas que se ha atribuido a la disminución de las funciones cognitivas, es la reducción de los niveles de D-serina que ocurre como un proceso natural en el envejecimiento. Esto debido a que la enzima serina racemasa, que cataboliza la síntesis de serina, se encuentra disminuida en sujetos envejecidos [76]. Esto sugiere, que la administración de D-serina de manera oral, podría ayudar a restaurar las funciones que se afectan con la edad. Para probar esta hipótesis, administramos D-serina (oral) por 2 meses y evaluamos el efecto sobre la flexibilidad cognitiva, la atención y la locomoción.

9.5. Efecto de la D-serina sobre la flexibilidad cognitiva y la atención en ratas de 18 meses

Con el fin de analizar si la D-serina mejoraba el deterioro en la flexibilidad cognitiva y la atención, que ocurre por un proceso de envejecimiento, realizamos un estudio longitudinal de las ratas de 12 meses. Es decir, una vez medida estas funciones cognitivas, las ratas continuaron alojadas individualmente y se dejaron envejecer hasta los 16 meses de edad, iniciándoles la administración oral de D-serina (diluido en el agua de beber) durante 2 meses (hasta que las ratas cumplieron

18 meses de edad). Las ratas se dividieron en 3 grupos, las que solo bebieron agua (18 m + agua), las que recibieron la dosis de 30mg/kg de peso de D-serina (18 m + 30 mg) y las que reciban 300 mg/kg de peso de D-serina (18 m + 300 mg). Cuando cumplieron los 18 meses, las ratas fueron reentrenadas durante 8 días en la tarea para presionar la palanca ipsilateral al estímulo luminoso, 24 horas previas al inicio de la evaluación de flexibilidad cognitiva se suspendió la administración de D-serina con el fin de evitar efectos agudos de la D-serina. Se compararon los resultados de los grupos de las ratas de 18 meses del grupo longitudinal (18 m + agua; 18 m + D-ser 30 mg; 18 m + D-ser 300 mg) y las de 18 meses que no habían sido evaluadas previamente (18 meses). Los resultados mostraron que, para nuestra sorpresa, tanto los grupos de D-serina como el que recibió solo agua, tenían un mejor desempeño que las ratas de 18 meses, e incluso mejor que las ratas de 6 meses (Fig. 6). Las ratas de 6 meses de edad obtuvieron un promedio de perseveraciones, de 52.90 para las ratas de seis meses, 76.35 para las de 12 meses, 83.80 en las de 18 meses sin evaluación previa y en las de 18 meses del grupo longitudinal tuvieron un promedio de 46.41 en las que se les administro 30 mg de D-serina, 51.80 a las que se les dio 300 mg y 61.08 en las que únicamente se les administro agua. Estos resultados sugieren que la experiencia de haber aprendido la tarea de flexibilidad cognitiva a los 12 meses pudo haber generado un aprendizaje en la rata sobre la tarea que le permitió después, a los 18 meses, resolver la situación. Además de esto, la exposición previa a la tarea pudo haber generado una reserva cognitiva de tal magnitud que revirtió el deterioro de la flexibilidad que ocurre durante el envejecimiento. Diversos estudios han mostrado que la reserva cognitiva beneficia el desempeño de las funciones cognitivas [86,87]. Es probable que el efecto de la reserva cognitiva sea tan grande que el efecto de la D-serina no se haya evidenciado. De esta manera, para responder la hipótesis de que la administración de D-serina mejora el desempeño de la flexibilidad cognitiva, sería necesario repetir el experimento, pero con un estudio transversal en lugar de longitudinal.

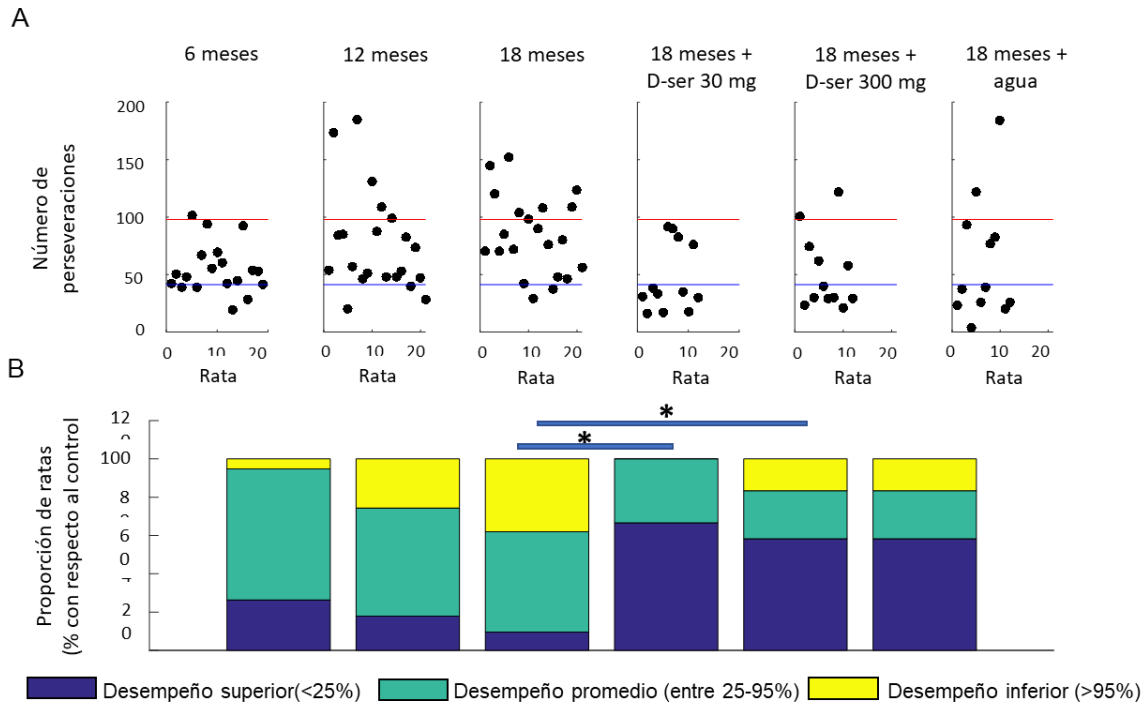


Figura 6. Efecto de la administración oral de D-serina sobre la flexibilidad cognitiva, (A) Número de perseveraciones realizadas durante una sesión por cada rata. (B) Proporción de ratas según su desempeño en la prueba de flexibilidad cognitiva U de Mann-Whitney * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$.

Al finalizar la evaluación de flexibilidad cognitiva, se regresó a las ratas a la fase dos del entrenamiento en el que debían presionar la palanca ipsilateral al estímulo luminoso. 24 horas posteriores a esto, se les evaluó atención durante tres sesiones y se realizó un promedio de estas. Los resultados obtenidos en esta evaluación se muestran en la figura 6. Se contabilizó el número de aciertos totales (suma de aciertos de 10 s, 2.5 s, 0.5 s) y se comparó con el desempeño de las ratas de 18 meses (con y sin D-serina). Encontramos que las ratas a las que se les administro D-serina realizaban un mayor número de aciertos (Fig. 7 A y B) en comparación con los grupos a los que solo se les administro agua o los que se midieron solo una vez. Al igual que como sucedió en la flexibilidad cognitiva encontramos que a mayor dosis de D-serina mayor era el número de aciertos que realizaban las ratas (Fig. 7 A). Al cuantificar las ratas según su desempeño, se observó que la proporción de ratas con un desempeño inferior disminuía en los grupos a los que se les administro D-serina, de igual manera se observó que en el

grupo con mayor dosis de D-serina (300 mg/kg de peso) era menor la proporción de ratas con un desempeño inferior en comparación con las ratas con una dosis de 30 mg/kg de peso (Fig. 7 B). Estos resultados nos sugieren que la mejora en el desempeño en una prueba de atención es dosis dependiente de la administración de D-serina (Fig. 7)

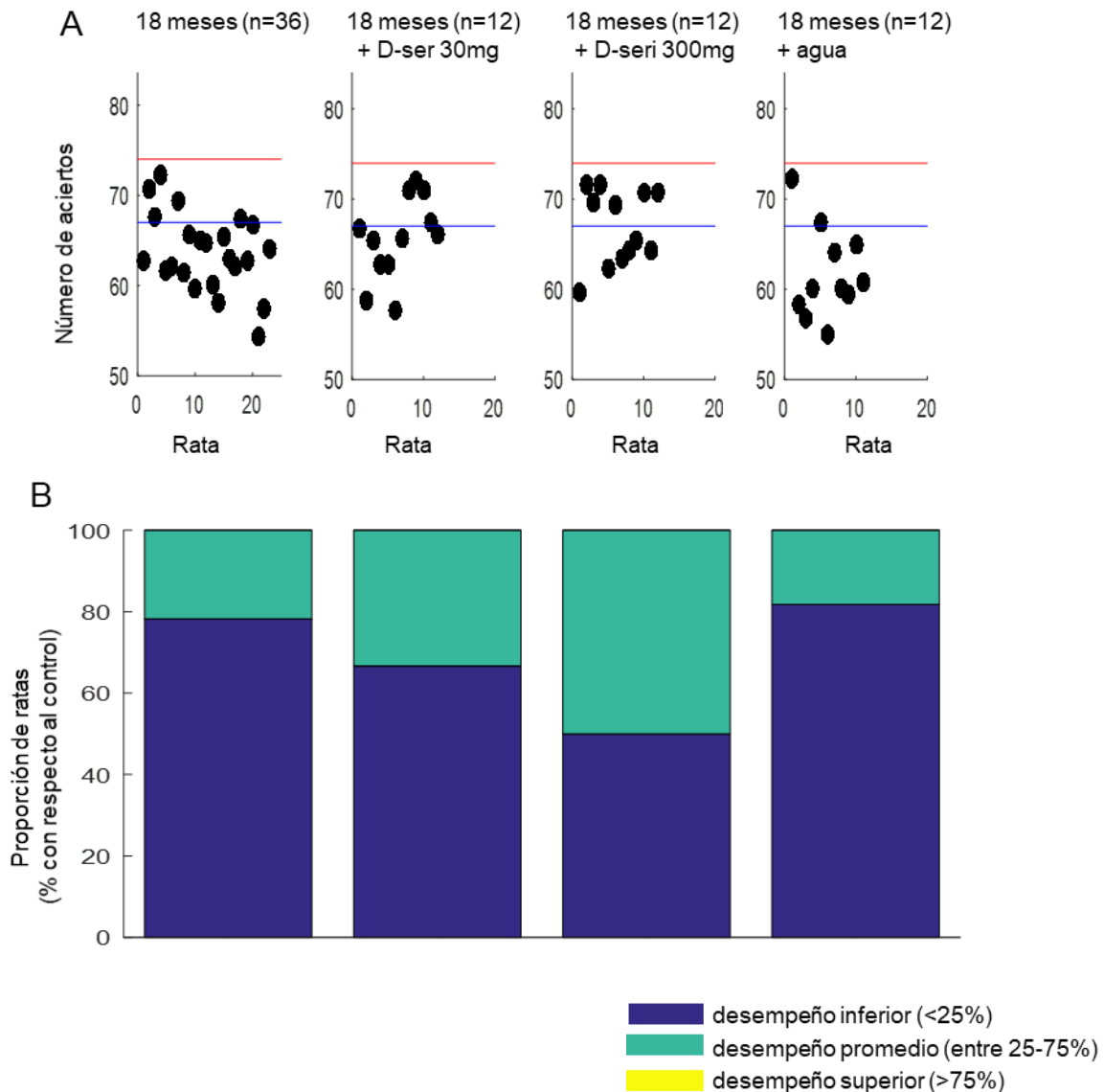


Figura 7. Efecto de la administración oral de D-serina sobre la atención. Las ratas fueron evaluadas contabilizando el número de aciertos (presión de la palanca ipsilateral a la luz). **A**, total del número de aciertos obtenidos con diferentes duraciones del estímulo luminoso (10 s, 2.5 s, y 0.5 s). **B**, Proporción de ratas según su desempeño en la prueba de atención.

De igual manera, se cuantifico la proporción de ratas según su desempeño para los aciertos según la duración del estímulo luminoso y se compararon las ratas

a las que se les administro D-serina con las que recibieron únicamente agua (18 meses + agua) (Fig. 8)

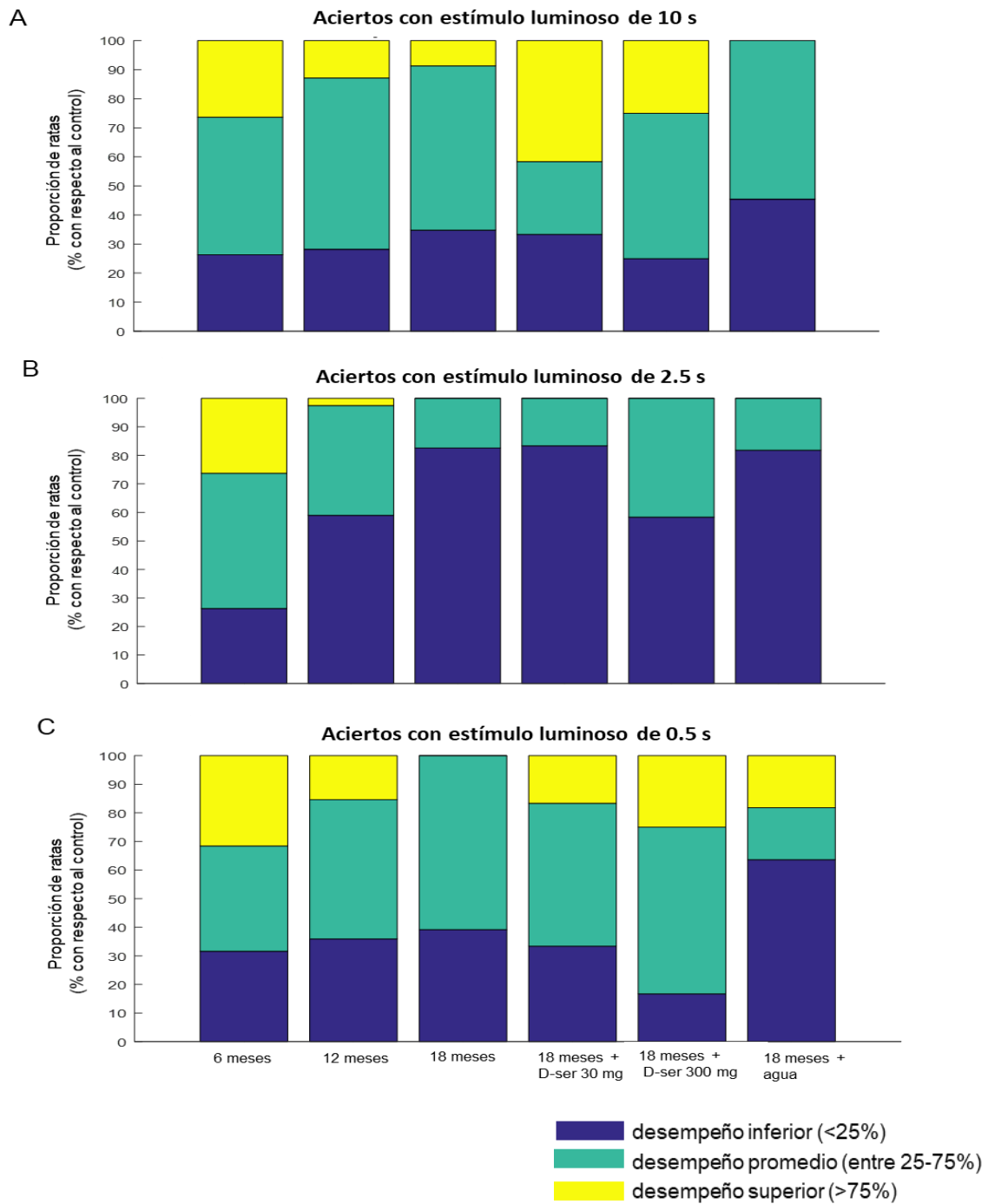


Figura 8. Efecto de la administración oral de D-serina en una prueba de atención. Proporción de ratas según su desempeño en la prueba de atención, el dónde la duración del estímulo vario entre 10s (A), 2.5s (B) y 0.5s (C).

Debido a que la D-serina es el principal co-agonista endógeno de los receptores NMDA, los cuales son fundamentales para las funciones cognitivas, y se han asociado con una disminución del desempeño de estas durante el envejecimiento, no es de extrañarse que la administración crónica de D-serina en ratas de 18 meses haya mejorado el desempeño de la atención en comparación de no suplementadas. Respecto al efecto de la D-serina sobre la Flexibilidad cognitiva, no es concluyente ya que esta prueba es sensible a la experiencia previa del animal por lo que no se pueden sacar conclusiones. Sin embargo, resultados de las ratas de 12 meses que recibieron una sola dosis de D-serina 40 min antes de evaluar la flexibilidad cognitiva, muestran un efecto potenciador similar al que presenta el grupo longitudinal, reforzando la idea de que el efecto de la D-serina se encuentra enmascarado por la reserva cognitiva y el aprendizaje previo.

En estudios previos se ha asociado a la D-serina con el desempeño de funciones cognitivas. En este sentido, Huili Han y cols. [85] encontraron que al administrar D-serina (800 mg/kg de peso) exógena en ratas, mejoraba en el desempeño de la memoria (5) y el aprendizaje (6). De igual manera, en un estudio realizado por López-Hidalgo y cols., en el 2012, mostraron que los niveles óptimos de D-serina eran importantes para establecer la memoria a largo plazo de las ratas [11].

Nuestros resultados sugieren que la D-serina administrada crónicamente por vía oral atravesó la barrera hematoencefálica y llegó a zonas cerebrales involucradas en funciones como la flexibilidad cognitiva la atención, tales como la corteza prefrontal, la corteza premotora, el hipocampo, el cíngulo, el tálamo, entre otros mejorando el desempeño en estas.

9.6. Efecto de la D-serina sobre la actividad locomotora en ratas de 18 meses

Una vez que se concluyeron las evaluaciones cognitivas, nos preguntamos si habría una mejora en la actividad locomotora espontánea en las ratas a las que se les administró D-serina. Para esto, se colocaron a las ratas en ruedas para medir

la actividad locomotora espontanea. Se contabilizo la distancia total recorrida por las ratas. De manera interesante observamos que las ratas a las que se les administro D-serina de manera oral, recorrían una mayor distancia. Así, el grupo que recibió la dosis de 30 mg recorrió en promedio 356 m, en el grupo con dosis de 300 mg se observó un aumento marcado con una distancia promedio de 397 m, esto en comparación con las ratas de la misma edad a las que no se les administro las cuales recorrieron una distancia promedio de 310 m (Fig. 9 A).

Ya que los NMDAR son necesarios para la realización de la actividad locomotora [89,90], era de esperarse que al administrar D-serina encontraríamos una mejora en la actividad locomotora, como observamos en los resultados obtenidos en el presente trabajo. Probablemente la D-serina que administramos de manera oral, llega a zonas involucradas con esta actividad tales como el tálamo y la corteza motora, áreas donde se encuentran presentes los NMDAR.

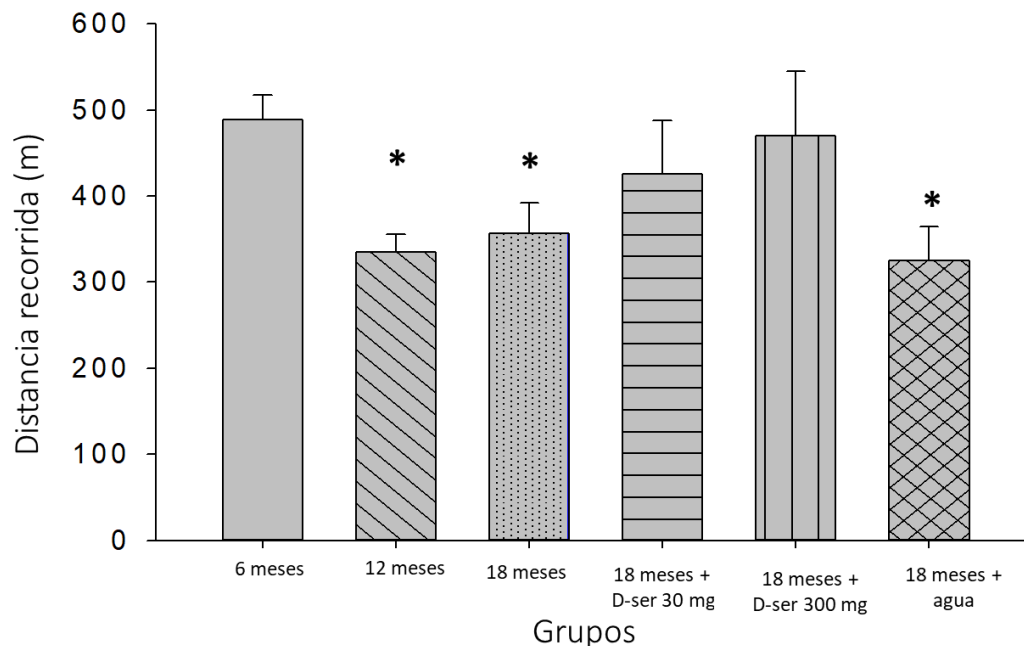
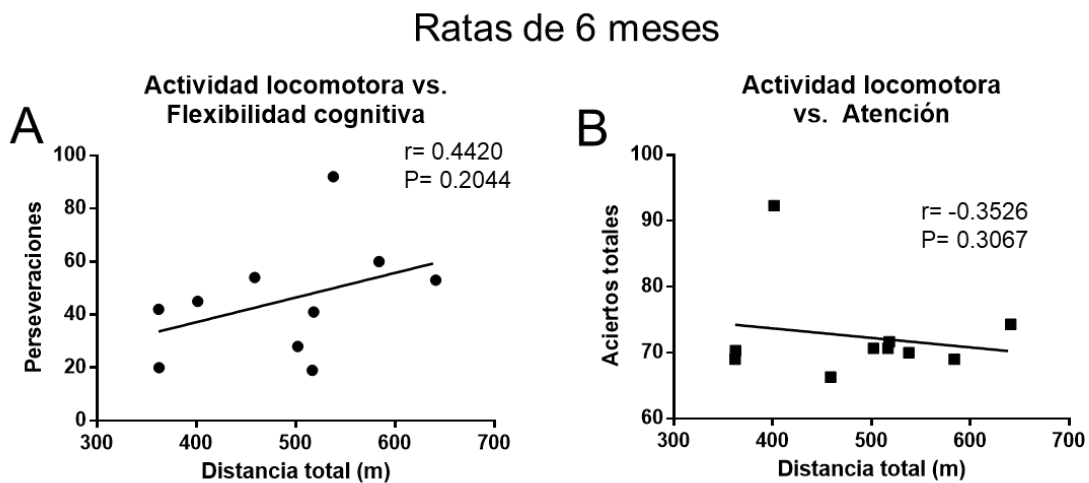


Figura 9. Efecto de la D-serina sobre la actividad locomotora espontanea. Comparación del promedio y el EE de la distancia total recorrida por cada grupo de ratas. F=4.80, *p<0.05, ANOVA

9.7. Correlación de la actividad locomotora con flexibilidad cognitiva y atención en ratas de 6, 12 y 18 meses

Al finalizar las evaluaciones de las funciones cognitivas de las ratas y su actividad locomotora espontanea, quisimos saber si había alguna relación entre el desempeño cognitivo y la actividad locomotora espontánea de la rata. Los coeficientes de correlación (obtenidos con la prueba de Spearman) del desempeño en las tareas de flexibilidad cognitiva y atención y su relación con la distancia recorrida por las ratas de 6, 12 y 18 meses de edad se muestran en la figura 9. Se observó una tendencia de asociación positiva entre la distancia recorrida y el número de perseveraciones que hacia una rata tanto en las ratas de 6, 12 y 18 meses de edad (Fig. 10 **A, B y C**). Al comparar el desempeño en atención, no observamos diferencias significativas ni tendencias importantes (Fig. 10 **D, F**)



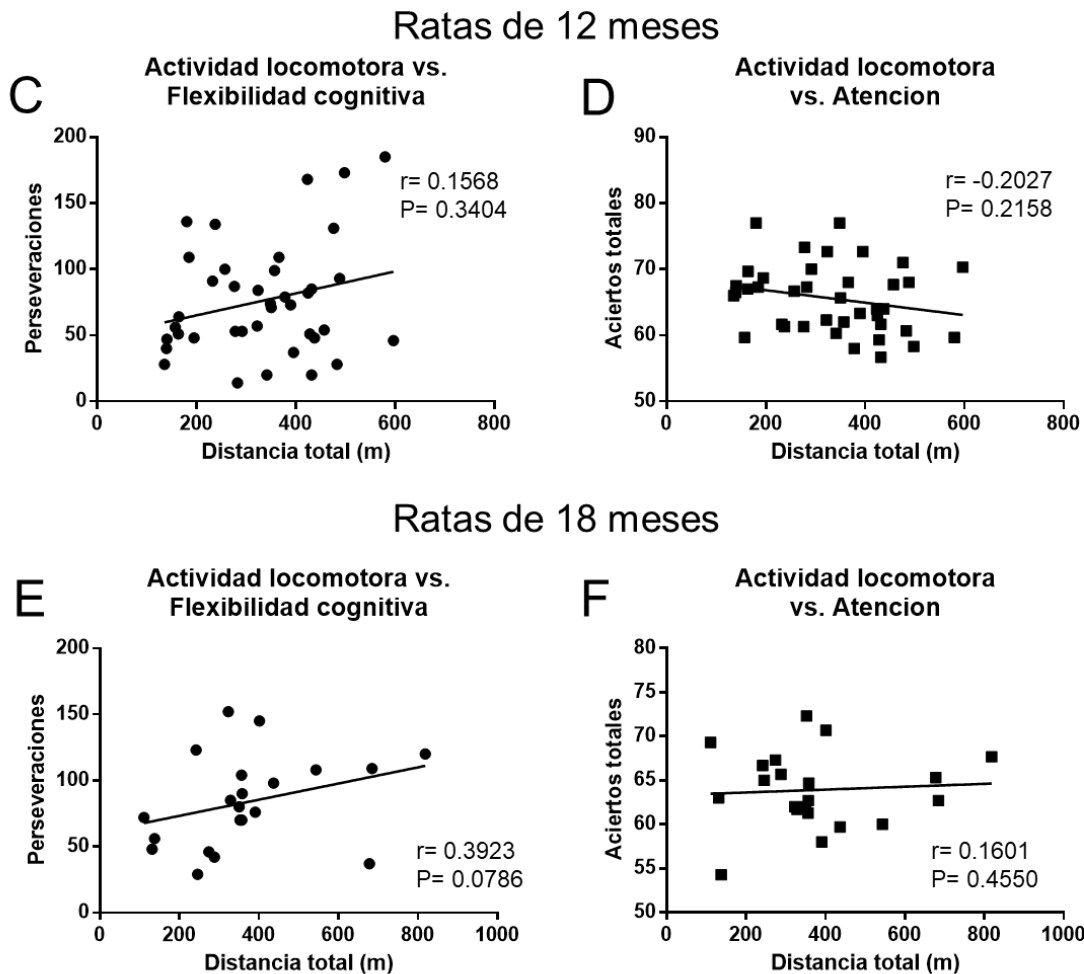


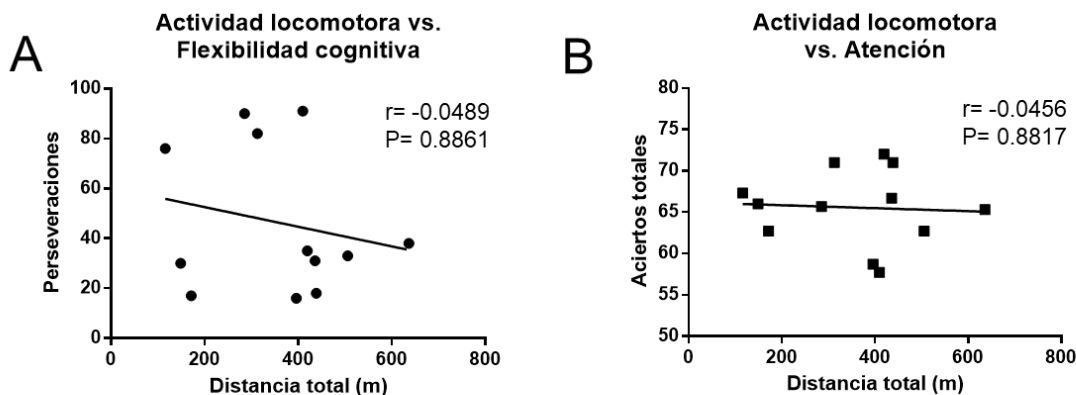
Figura 10. Correlaciones entre el desempeño en actividad locomotora y en las pruebas cognitivas de flexibilidad cognitiva y atención, en ratas de 6, 12 y 18 meses de edad.

9.8. Correlación de la actividad locomotora con flexibilidad cognitiva y atención en ratas de 18 meses tratadas con D-serina

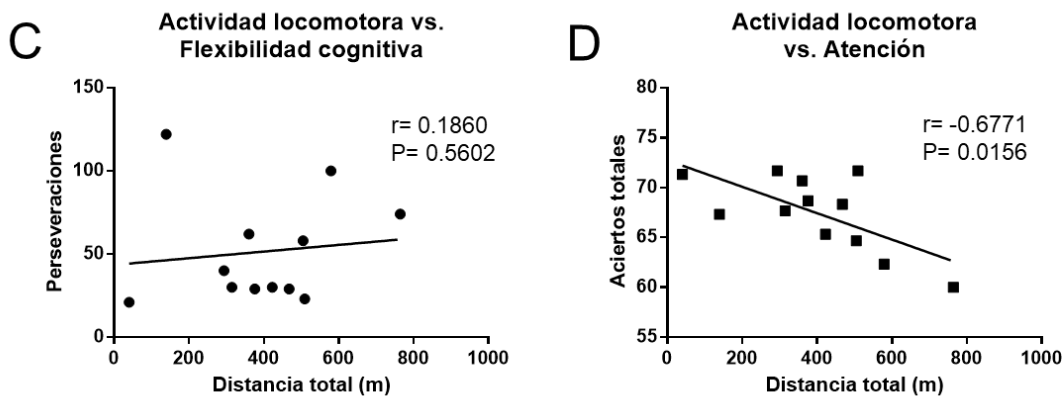
Se hizo el mismo análisis de correlaciones para los grupos de ratas de 18 meses de edad que fueron tratados con D-serina o que únicamente se les administro agua, los resultados de estos se muestran en la figura 11. Las ratas tratadas con D-serina (30 mg/kg y 300 mg/kg de peso), mostraron coeficientes de correlación inferiores a sus homologas de 18 meses (Fig. 11 **A**). En las ratas a las que únicamente se les administro agua no se observó ninguna tendencia. Al comparar la actividad locomotora con el desempeño en atención vimos un

comportamiento distinto que el encontrado en flexibilidad cognitiva, en las ratas con 30 mg de D-serina no se observó ninguna tendencia (Fig. 11 B), sin embargo, en las ratas con una dosis de 300 mg, se observó una correlación significativa negativa, entre el número de aciertos y la distancia total recorrida (Fig. 11 D), es decir, entre más actividad locomotora tenían, mayor era su atención (Fig. 11 F).

18 meses + D-serina 30 mg



18 meses + D-serina 300 mg



18 meses + agua sin D-serina

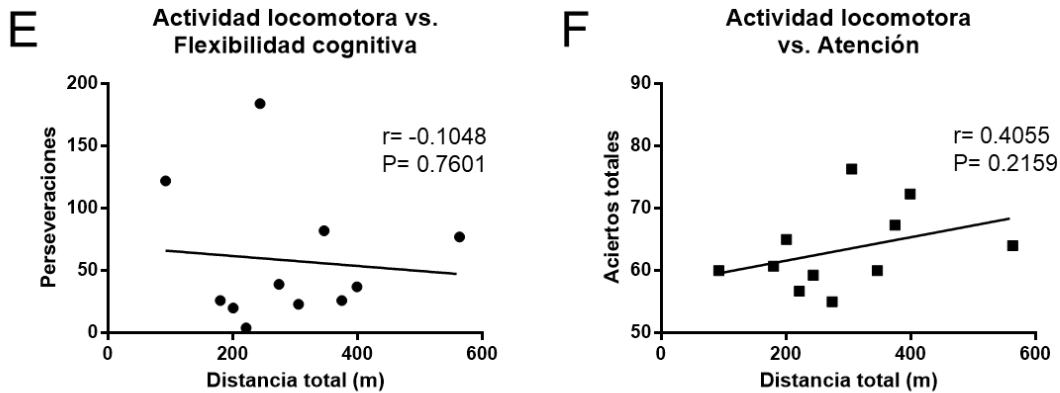


Figura 11. Correlaciones entre el desempeño en actividad locomotora y en las pruebas cognitivas de flexibilidad cognitiva y atención, en ratas de 18 meses tratadas con D-serina o únicamente agua.

Resulta interesante al analizar el comportamiento de las ratas de 6, 12 y 18 meses de edad el cual es similar al relacionar su actividad locomotora espontanea, con su desempeño en la evaluación de flexibilidad cognitiva, presentando una tendencia positiva. Probablemente, ya desde los seis meses va habiendo una afectación de esta función, ya que, las ratas a las que se les administró D-serina se observó que las que recorrían una mayor distancia presentaban un mejor desempeño en la flexibilidad cognitiva, de igual manera este grupo de ratas fueron las que presentaron un mejor desempeño en esta función. Al comparar el desempeño de las ratas en la prueba de atención con la actividad locomotora espontanea no vemos ninguna correlación, salvo con la administración de 300 mg/kg de peso de D-serina, en donde las ratas con mayor actividad locomotora son aquellas que se desempeñaron mejor en las tareas de atención.

Con el presente trabajo de investigación podemos concluir lo siguiente:

- i. La flexibilidad cognitiva y la atención disminuye progresivamente con la edad, viéndose afectada en ratas desde los 12 meses de edad.
- ii. La actividad locomotora espontanea en las ratas disminuye con la edad.
- iii. Al administrar D-serina de manera crónica, se restauran funciones como la flexibilidad cognitiva y se presenta una mejora en el desempeño en pruebas de atención.
- iv. Hay una clara contribución positiva de la reserva cognitiva sobre el desempeño de las funciones cognitivas, por lo que es necesario realizar un nuevo grupo de ratas, que no hayan sido expuestas a ningún entrenamiento ni evaluación previa.
- v. La actividad locomotora espontanea de las ratas de 18 meses mejoro al administrarles D-serina de manera crónica.

Por lo que podemos decir que hay una disminución de las funciones cognitivas y de la actividad locomotora con la edad, que se ve restaurada al administrar D-serina

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Strong, K. L., Jing, Y., Prosser, A. R., Traynelis, S. F., & Liotta, D. C. (2014). NMDA receptor modulators: an updated patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(12), 1349-1366.
2. Eva Pastalkova, Peter Serrano, Deana Pinkhasova, Emma Wallace, André Antonio Fenton†, Todd Charlton Sacktor†. Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP *Science* 2006: Vol. 313, Issue 5790.
3. M. Darvasa, R.D. Palmiter. Specific contributions of N-methyl-d-aspartate receptors in the dorsal striatum to cognitive flexibility. *Neuroscience*, Volume 284, Issue null
4. Randy L. Buckner. Memory and Executive Function in Aging and AD September 2004. Vol, 44, Issue 1
5. Buckner, R. L. (2004). Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron*, 44(1), 195-208.
6. Hallett, P. J., & Standaert, D. G. (2004). Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacology & therapeutics*, 102(2), 155-174.
7. Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333-1341.
8. Coyle, J. T. (2012). NMDA receptor and schizophrenia: a brief history. *Schizophrenia bulletin*, 38(5), 920-926.
9. Guidi, M., Rani, A., Karic, S., Severance, B., Kumar, A., & Foster, T. C. (2015). Contribution of N-methyl-D-aspartate receptors to attention and episodic spatial memory during senescence. *Neurobiology of learning and memory*, 125, 36-46.
10. Zamzow, D. R., Elias, V., Shumaker, M., Larson, C., & Magnusson, K. R. (2013). An increase in the association of GluN2B containing NMDA receptors with membrane scaffolding proteins was related to memory declines during aging. *The Journal of Neuroscience*, 33(30), 12300-12305.

11. López-Hidalgo, M., Salgado-Puga, K., Alvarado-Martínez, R., Medina, A. C., Prado-Alcalá, R. A., & García-Colunga, J. (2012). Nicotine uses neuron-glia communication to enhance hippocampal synaptic transmission and long-term memory. *PloS one*, 7(11), e49998.
12. Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., & Takahashi, K. (1993). Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *Journal of neurochemistry*, 60(2), 783-786.
13. Junjaud, G., Rouaud, E., Turpin, F., Mothet, J. P., & Billard, J. M. (2006). Age-related effects of the neuromodulator d-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat. *Journal of neurochemistry*, 98(4), 1159-1166.
14. Billard, J. M. (2015). d-Serine in the aging hippocampus. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 116, 18-24.
15. Organización mundial de la salud (2015) Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud.
16. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico del adulto mayor en México.
17. Terry, R. D., & Katzman, R. (2001). Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiology of aging*, 22(3), 347-348.
18. Dickstein, D. L., Kabaso, D., Rocher, A. B., Luebke, J. I., Wearne, S. L., & Hof, P. R. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging cell*, 6(3), 275-284.
19. Harada, C. N., Love, M. C. N., & Triebel, K. L. (2013). Normal cognitive aging. *Clinics in geriatric medicine*, 29(4), 737-752.
20. O'sullivan, M., Summers, P. E., Jones, D. K., Jarosz, J. M., Williams, S. C. R., & Markus, H. S. (2001). Normal-appearing white matter in ischemic leukoaraiosis: a diffusion tensor MRI study. *Neurology*, 57(12), 2307-2310.
21. Dickstein, D. L., Kabaso, D., Rocher, A. B., Luebke, J. I., Wearne, S. L., & Hof, P. R. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging cell*, 6(3), 275-284.

22. Murman, D. L. (2015, August). The Impact of Age on Cognition. In *Seminars in Hearing* (Vol. 36, No. 03, pp. 111-121). Thieme Medical Publishers.
23. Rais, R., Thomas, A. G., Wozniak, K., Wu, Y., Jaaro-Peled, H., Sawa, A., ... & Slusher, B. S. (2012). Pharmacokinetics of oral D-serine in D-amino acid oxidase knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(11), 2067-2073.
24. Kasai, Y., Tachikawa, M., Hirose, S., Akanuma, S. I., & Hosoya, K. I. (2011). Transport systems of serine at the brain barriers and in brain parenchymal cells. *Journal of neurochemistry*, 118(2), 304-313.
25. Williams, S. M., Diaz, C. M., Macnab, L. T., Sullivan, R. K., & Pow, D. V. (2006). Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons. *Glia*, 53(4), 401-411.
26. Zhang, Z., Gong, N., Wang, W., Xu, L., & Xu, T. L. (2008). Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cerebral Cortex*, 18(10), 2391-2401.
27. Mothet, J. P., Rouaud, E., Sinet, P. M., Potier, B., Jouvenceau, A., Dutar, P., & Billard, J. M. (2006). A critical role for the glial-derived neuromodulator d-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging cell*, 5(3), 267-274.
28. Hashimoto, A., & Chiba, Y. (2004). Effect of systemic administration of D-serine on the levels of D-and L-serine in several brain areas and periphery of rat. *European journal of pharmacology*, 495(2), 153-158.
29. Labarrière, M., Thomas, F., Dutar, P., Pollegioni, L., Wolosker, H., & Billard, J. M. (2014). Circuit-specific changes in D-serine-dependent activation of the N-methyl-D-aspartate receptor in the aging hippocampus. *Age*, 36(5), 1-12.
30. Guercio, G. D., Bevictori, L., Vargas-Lopes, C., Madeira, C., Oliveira, A., Carvalho, V. F., ... & Panizzutti, R. (2014). D-serine prevents cognitive deficits induced by acute stress. *Neuropharmacology*, 86, 1-8.
31. Kantrowitz, J. T., Woods, S. W., Petkova, E., Cornblatt, B., Corcoran, C. M., Chen, H., ... & Javitt, D. C. (2015). D-serine for the treatment of negative

- symptoms in individuals at clinical high risk of schizophrenia: a pilot, double-blind, placebo-controlled, randomised parallel group mechanistic proof-of-concept trial. *The Lancet Psychiatry*, 2(5), 403-412.
32. Heresco-Levy, U., Javitt, D. C., Ebstein, R., Vass, A., Lichtenberg, P., Bar, G., & Ermilov, M. (2005). D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biological psychiatry*, 57(6), 577-585.
33. Otte, D. M., de Arellano, M. L. B., Bilkei-Gorzo, A., Albayram, Ö., Imbeault, S., Jeung, H., & Zimmer, A. (2013). Effects of chronic D-serine elevation on animal models of depression and anxiety-related behavior. *PloS one*, 8(6), e67131.
34. Duffy, S., Labrie, V., & Roder, J. C. (2008). D-serine augments NMDA-NR2B receptor-dependent hippocampal long-term depression and spatial reversal learning. *Neuropsychopharmacology*, 33(5), 1004-1018.
35. Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in neurosciences*, 33(3), 153-161.
36. Mothet, J. P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., & Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5606-5611.
37. Schell, M. J., Molliver, M. E., & Snyder, S. H. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(9), 3948-3952.
38. Schell, M. J., Brady Jr, R. O., Molliver, M. E., & Snyder, S. H. (1997). D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *The Journal of neuroscience*, 17(5), 1604-1615.
39. Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R. T., O'Dell, T. J., & Khakh, B. S. (2013). TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels

- and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *The Journal of Neuroscience*, 33(24), 10143-10153
40. Hatanaka, T., Huang, W., Nakanishi, T., Bridges, C. C., Smith, S. B., Prasad, P. D., & Ganapathy, V. (2002). Transport of d-serine via the amino acid transporter ATB 0+ expressed in the colon. *Biochemical and biophysical research communications*, 291(2), 291-295.
 41. Silbernagl, S., Völker, K., & Dantzer, W. H. (1999). D-Serine is reabsorbed in rat renal pars recta. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 276(6), F857-F863.
 42. Ding, X., Qiao, Y., Piao, C., Zheng, X., Liu, Z., & Liang, J. (2014). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate transmission in nucleus accumbens plays a more important role than that in dorsal striatum in cognitive flexibility. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8.
 43. Rosenberg, D., Artoul, S., Segal, A. C., Kolodney, G., Radzishovsky, I., Dikopoltsev, E., & Wolosker, H. (2013). Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *The Journal of Neuroscience*, 33(8), 3533-3544.
 44. Rutter, A. R., Fradley, R. L., Garrett, E. M., Chapman, K. L., Lawrence, J. M., Rosahl, T. W., & Patel, S. (2007). Evidence from gene knockout studies implicates Asc-1 as the primary transporter mediating d-serine reuptake in the mouse CNS. *European Journal of Neuroscience*, 25(6), 1757-1766.
 45. Matsui, T. A., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T., & Wada, K. (1995). Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: The effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *Journal of neurochemistry*, 65(1), 454-458.
 46. Heresco-Levy, U., Javitt, D. C., Ermilov, M., Mordel, C., Silipo, G., & Lichtenstein, M. (1999). Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Archives of general psychiatry*, 56(1), 29-36.

47. Driscoll, I., Davatzikos, C., An, Y., Wu, X., Shen, D., Kraut, M., & Resnick, S. M. (2009). Longitudinal pattern of regional brain volume change differentiates normal aging from MCI. *Neurology*, 72(22), 1906-1913.
48. Salat, D. H., Kaye, J. A., & Janowsky, J. S. (1999). Prefrontal gray and white matter volumes in healthy aging and Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 56(3), 338-344.
49. Duan, H., Wearne, S. L., Rocher, A. B., Macedo, A., Morrison, J. H., & Hof, P. R. (2003). Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cerebral Cortex*, 13(9), 950-961.
50. Salthouse, T. A. (2010). Influence of age on practice effects in longitudinal neurocognitive change. *Neuropsychology*, 24(5), 563.
51. Darvas, M., & Palmiter, R. D. (2015). Specific contributions of N-methyl-D-aspartate receptors in the dorsal striatum to cognitive flexibility. *Neuroscience*, 284, 934-942.
52. Beas, B. S., Setlow, B., & Bizon, J. L. (2013). Distinct manifestations of executive dysfunction in aged rats. *Neurobiology of aging*, 34(9), 2164-2174.
53. Stefani, M. R., & Moghaddam, B. (2005). Systemic and prefrontal cortical NMDA receptor blockade differentially affect discrimination learning and set-shift ability in rats. *Behavioral neuroscience*, 119(2), 420.
54. Dalton, G. L., Ma, L. M., Phillips, A. G., & Floresco, S. B. (2011). Blockade of NMDA GluN2B receptors selectively impairs behavioral flexibility but not initial discrimination learning. *Psychopharmacology*, 216(4), 525-535.
55. Driscoll, I., Davatzikos, C., An, Y., Wu, X., Shen, D., Kraut, M., & Resnick, S. M. (2009). Longitudinal pattern of regional brain volume change differentiates normal aging from MCI. *Neurology*, 72(22), 1906-1913.
56. Haley, G. E., Kohama, S. G., Urbanski, H. F., & Raber, J. (2010). Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2, apoE, and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampus. *Age*, 32(3), 283-296.
57. Wu, S., Barger, S. W., & Sims, T. J. (2004). Schwann cell and epineural fibroblast expression of serine racemase. *Brain research*, 1020(1), 161-166.

58. Caprioli, A., Ghirardi, O., Giuliani, A., Ramacci, M. T., & Angelucci, L. (1991). Spatial learning and memory in the radial maze: A longitudinal study in rats from 4 to 25 months of age. *Neurobiology of Aging*, 12(5), 605-607.
59. Salthouse, T. A. (2009). When does age-related cognitive decline begin? *Neurobiology of aging*, 30(4), 507-514.
60. Guidi, M., Kumar, A., & Foster, T. C. (2015). Impaired attention and synaptic senescence of the prefrontal cortex involves redox regulation of NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, 35(9), 3966-3977.
61. Lie, C. H., Specht, K., Marshall, J. C., & Fink, G. R. (2006). Using fMRI to decompose the neural processes underlying the Wisconsin Card Sorting Test. *Neuroimage*, 30(3), 1038-1049.
62. Balu, D. T., Takagi, S., Puhl, M. D., Benneyworth, M. A., & Coyle, J. T. (2014). D-serine and serine racemase are localized to neurons in the adult mouse and human forebrain. *Cellular and molecular neurobiology*, 34(3), 419-435.
63. Ma, M. C., Huang, H. S., Chen, Y. S., & Lee, S. H. (2008). Mechanosensitive N-methyl-D-aspartate receptors contribute to sensory activation in the rat renal pelvis. *Hypertension*, 52(5), 938-944.
64. Ghasemi-Kasman, M., Dehpour, A. R., & Mani, A. R. (2012). D-serine modulates non-adrenergic non-cholinergic contraction of lower esophageal sphincter in rats. *European journal of pharmacology*, 696(1), 155-160.
65. Takarada, T., Hinoi, E., Takahata, Y., & Yoneda, Y. (2008). Serine racemase suppresses chondrogenic differentiation in cartilage in a Sox9-dependent manner. *Journal of cellular physiology*, 215(2), 320-328.
66. Horiike, K., Tojo, H., Arai, R., Nozaki, M., & Maeda, T. (1994). D-amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: regional differentiation of astrocytes. *Brain research*, 652(2), 297-303.
67. Verrall, L., Walker, M., Rawlings, N., Benzel, I., Kew, J. N., Harrison, P. J., & Burnet, P. W. (2007). d-Amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *European Journal of Neuroscience*, 26(6), 1657-1669.

68. Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., & Oliet, S. H. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, 150(3), 633-646.
69. Ohno, M., Yamamoto, T., & Watanabe, S. (1994). Intrahippocampal administration of a glycine site antagonist impairs working memory performance of rats. *European journal of pharmacology*, 253(1), 183-187.
70. Luebke, J. I., Chang, Y. M., Moore, T. L., & Rosene, D. L. (2004). Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience*, 125(1), 277-288.
71. Potier, B., Turpin, F. R., Sinet, P. M., Rouaud, E., Mothet, J. P., Videau, C., & Billard, J. M. (2010). Contribution of the d-serine-dependent pathway to the cellular mechanisms underlying cognitive aging. *Frontiers in aging neuroscience*, 2, 1.
72. Miyoshi, Y., Hamase, K., Okamura, T., Konno, R., Kasai, N., Tojo, Y., & Zaitzu, K. (2011). Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free D-serine and D-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking D-amino-acid oxidase. *Journal of Chromatography B*, 879(29), 3184-3189.
73. Wolosker, H., Sheth, K. N., Takahashi, M., Mothet, J. P., Brady, R. O., Ferris, C. D., & Snyder, S. H. (1999). Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 721-725.
74. Wolosker, H., & Mori, H. (2012). Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. *Amino acids*, 43(5), 1895-1904.
75. Konno, R., Sasaki, M., Asakura, S., Fukui, K., Enami, J., & Niwa, A. (1997). D-Amino-acid oxidase is not present in the mouse liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1335(1), 173-181.
76. Turpin, F. R., Potier, B., Dulong, J. R., Sinet, P. M., Alliot, J., Oliet, S. H. R., & Billard, J. M. (2011). Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiology of aging*, 32(8), 1495-1504.

77. Bygrave, A. M., Masiulis, S., Nicholson, E., Berkemann, M., Barkus, C., Sprengel, R. & Kätzel, D. (2016). Knockout of NMDA-receptors from parvalbumin interneurons sensitizes to schizophrenia-related deficits induced by MK-801. *Translational psychiatry*, 6(4), e778.
78. Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 323, 170-182.
79. CONAPO Elena Zúñiga y Daniel Vega Envejecimiento de la Población de México Reto del siglo XXI.
80. Ruegsegger, G. N., Toedebusch, R. G., Childs, T. E., Grigsby, K. B., & Booth, F. W. (2017). Loss of Cdk5 function in the nucleus accumbens decreases wheel running and may mediate age-related declines in voluntary physical activity. *The Journal of physiology*, 595(1), 363-384.
81. Hamezah, H. S., Durani, L. W., Ibrahim, N. F., Yanagisawa, D., Kato, T., Shiino, A., ... & Tooyama, I. (2017). Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. *Experimental gerontology*, 99, 69-79.
82. Staples, M. C., Somkuwar, S. S., & Mandyam, C. D. (2015). Developmental effects of wheel running on hippocampal glutamate receptor expression in young and mature adult rats. *Neuroscience*, 305, 248-256.
83. Siette, J., Westbrook, R. F., Cotman, C., Sidhu, K., Zhu, W., Sachdev, P., & Valenzuela, M. J. (2013). Age-specific effects of voluntary exercise on memory and the older brain. *Biological psychiatry*, 73(5), 435-442.
84. Shevtsova, O., Tan, Y. F., Merkley, C. M., Winocur, G., & Wojtowicz, J. M. (2017). Early-Age Running Enhances Activity of Adult-Born Dentate Granule Neurons Following Learning in Rats. *eNeuro*, ENEURO-0237.
85. Han, H., Peng, Y., & Dong, Z. (2015). D-Serine rescues the deficits of hippocampal long-term potentiation and learning and memory induced by sodium fluoroacetate. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 133, 51-56.
86. Farmer, J., Zhao, X. V., Van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., & Christie, B. R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene

- expression in the dentate gyrus of adult male Sprague–Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 124(1), 71-79.
87. Bennett, J. C., McRae, P. A., Levy, L. J., & Frick, K. M. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiology of learning and memory*, 85(2), 139-152.
88. Ferreira, A. F., Real, C. C., Rodrigues, A. C., Alves, A. S., & Britto, L. R. (2010). Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain. *Brain research*, 1361, 31-42.
89. Li, W. C., Roberts, A., & Soffe, S. R. (2010). Specific brainstem neurons switch each other into pacemaker mode to drive movement by activating NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, 30(49), 16609-16620.
90. Acton, D., & Miles, G. B. (2017). Differential regulation of NMDA receptors by D-serine and glycine in mammalian spinal locomotor networks. *Journal of neurophysiology*, 117(5), 1877-1893.

Lista de abreviaturas

SNC:	Sistema Nervioso Central.
GFAP:	Proteína Acido Glio Fibrilar.
NMDA:	N-metil-D-aspartato.
NMDAR:	Receptor N-metil-D-aspartato.
Mg:	Magnesio.
LTP:	Potenciación a Largo Plazo.
ASCT:	Transportador Alanina-serina-cisteina.
DAAO:	D-amino acido oxidasa.