



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



TITULO DE TESIS

“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DIETA HIPERCALÓRICA SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL Y MORFOLOGÍA NEURONAL DE HIPOCAMPO EN RATA”

PARA OBTENER EL TITULO DE LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

MARTHA JIMENEZ ROJAS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA

Depto. Farmacia FCQ-BUAP

ASESORES DE TESIS:

Dr. Gonzalo Flores Álvarez
Lab. Neuropsiquiatría- IFBUAP

Dr. Samuel Treviño Mora
Depto. Análisis Clínicos FCQ-BUAP

25/Abril/2016

DEDICADO:

A mis padres José Ubaldo Jiménez Pérez y Alma Delia Rojas López por todo el apoyo incondicional que me han brindado, por ser mi ejemplo a seguir y el motor que me impulsa todos los días.

A mis hermanos Ubaldo, Juan Pablo y Emmanuel los niños de mi corazón, por verme como un ideal y siempre mantenerme con una sonrisa a pie.

A mis amigas Anahí, Alicia Angélica, Reina y Monserrat por guiarme y animarme a seguir, por todas las situaciones que me ayudaron a enfrentar, siempre en las buenas y en las malas, a cada una de ustedes le debo parte de mi vida.

A la Química Alejandra Puente Montes por inspirarme, por confiar en mí y ayudarme a dar el paso en el ámbito profesional, sin duda más que una colega, una amiga.

Y a todos aquellos que comparten momentos de mi historia, tal vez hoy no estén aquí pero que han sido parte de mi camino.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca por el apoyo, los consejos, orientación y dedicación para llevar a cabo este trabajo, sobre todo por siempre tener la disposición y la confianza en mí.

Al Dr. Gonzalo Flores Álvarez por contribuir en este proyecto, y por permitirme realizarlo en el instituto de Neuropsiquiatría- IFBUAP.

Así mismo al Dr. Samuel Treviño Mora del Depto. Análisis Clínicos FCQ-BUAP por su orientación y apoyo del mismo.

A mis sinodales, Dr. Rubén Antonio Vázquez Roque, Dr. José Albino Moreno Rodríguez, M.C. José Genaro Carmona Gutiérrez por aceptar ser parte de mi comité de revisión, por su dedicación y comentarios en la revisión de esta tesis.

Dr. Rubén de igual forma gracias por el apoyo brindado en el instituto durante todo el transcurso y por el impulso de seguir avanzando.

A mis compañeros del laboratorio por su compañía, comentarios y sugerencias para la mejora de este trabajo.

INDICE

1.-INTRODUCCIÓN	
1.1. Síndrome Metabólico, Diabetes Mellitus, Diabetes Mellitus I.....	5
1.2. Relación Diabetes Mellitus con daño neuronal.....	8
1.3. Síndrome Metabólico, neurotrofinas y plasticidad neuronal, daño cognitivo, aprendizaje y memoria.....	10
1.4. El hipocampo y el sistema límbico (CA1, CA3 y GD).....	12
1.5. Dietas hipercalóricas como inductores del Síndrome Metabólico en animales.....	14
2.-JUSTIFICACIÓN.....	16
3.-OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo General.....	16
3.2 Objetivos Particulares.....	16
4.-DIAGRAMA METODOLÓGICO.....	17
5.-METODOLOGIA.....	18
5.1. Animales de laboratorio.....	18
5.2. Determinación de los parámetros bioquímicos para valorar la inducción del Síndrome Metabólico.....	18
5.3. Zoometría.....	18
5.4. Memoria espacial, laberinto de Agua de Morris.....	19
5.5. Extracción de cerebros.....	20
5.6. Método de Golgi-Cox.....	21
5.7. Localización e identificación de neuronas.....	22
5.8. Análisis morfológico de Sholl.....	23
6.-RESULTADOS.....	24
6.1, 2,3. Efecto de la ingesta de DHC con respecto a una DNC sobre la morfología neuronal en CA1, CA3 y GD en rata.	
7.-DISCUSIÓN.....	39
8.-CONCLUSIÓN.....	40
9.-BIBLIOGRAFÍA.....	41

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Síndrome Metabólico y Diabetes Mellitus.

El síndrome metabólico es un conjunto de factores de riesgo para diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedad cardiovascular, caracterizado por la presencia de resistencia a la insulina e hiperinsulinismo, asociados con trastornos del metabolismo de los carbohidratos y lípidos, cifras elevadas de presión arterial, y obesidad. Desde principios del siglo XX se describieron asociaciones de factores de riesgo, no fue hasta el año 1988, donde Reaven observó que varios factores de riesgo (dislipidemia, hipertensión, hiperglicemia) tendían a estar juntos; a este conjunto lo llamó síndrome X. El término síndrome metabólico como entidad diagnóstica con criterios definidos fue introducido por la OMS en 1998. La prevalencia del síndrome metabólico varía según factores como género, edad, etnia, pero se ubica entre 15% y 40%; siendo mayor en la población de origen hispano.

Existen varios criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico. El más conocido es del ATP III, donde se deben cumplir 3 ó más de los siguientes parámetros: 1) perímetro abdominal elevado (>102 cm en hombres y >88 cm en mujeres), 2) TG >150 mg/dl y 3) glicemia >110 mg/dl incluyendo diabetes mellitus como diagnóstico.

Son considerados otros factores asociados al Síndrome Metabólico como trombogénesis, inflamación, ácido úrico, estrés, sedentarismo, edad, origen étnico, acantosis nigricans, síndrome de ovario poliquístico, microalbuminuria, hipotiroidismo primario, uso de inhibidores de proteasa para pacientes con VIH, exceso de glucocorticoides endógeno o exógeno.

Diabetes, AGA, ATG u HOMA que muestren resistencia a la insulina y al menos dos de los siguientes criterios:
Proporción cintura/cadera >0,90 m en varones o >0,85 m en mujeres
Triglicéridos en suero ≥ 150 mg/dl (8,3 mmol/l) o colesterol HDL <35 mg/dl (1,9 mmol/l) en varones y <39 mg/dl (2,2 mmol/l) en mujeres
Índice de excreción de albúmina en la orina >20 μ g/min
Tensión arterial $\geq 140/90$ mmHg

Figura 1. Definición de la OMS del Síndrome Metabólico.

Al menos dos de los siguientes criterios:
Perímetro de cintura ≥ 102 cm en varones o ≥ 88 cm en mujeres
Triglicéridos en suero ≥ 150 mg/dl (8,3 mmol/l) o tratamiento farmacológico
Colesterol HDL < 40 mg/dl (2,2 mmol/l) en varones y < 50 mg/dl (2,8 mmol/l) en mujeres o tratamiento farmacológico
Presión sistólica ≥ 130 mmHg o presión diastólica ≥ 85 mmHg o tratamiento farmacológico
Glucosa en suero ≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l) o tratamiento farmacológico

Figura 2. Definición del ATP III del Síndrome Metabólico.

El síndrome metabólico (SM) es un tema actual y de debate en la comunidad médica, y su enfoque es esencial, pues se relaciona con las enfermedades que causan mayor mortalidad a nivel mundial, este es uno de los grandes problemas que enfrenta actualmente la humanidad, ya que la civilización ha cambiado drásticamente, principalmente el estilo de vida que se lleva hoy en día, como es el consumo de dietas altas en carbohidratos y lípidos, el sedentarismo y muchas veces hasta la falta de información.

Las consecuencias a todo esto son de forma drástica ya que estas enfermedades terminan en casos de morbi-mortalidad, siendo los de mayor prevalencia aquellas relacionadas con enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus 2.

Como se ha venido mencionando la Diabetes mellitus 2 es una enfermedad que está muy relacionada con el SM, podríamos decir que es consecuente de dicho síndrome, definiéndola como un aumento crónico de glucosa en sangre (hiperglucemia); esto se debe a la producción deficiente de la hormona Insulina. Por lo tanto la persona que es diabética está expuesta a un riesgo permanente de sufrir daños, como son retinopatías, lesiones de nervios periféricos, arterosclerosis en el corazón, las piernas y en cerebro, al cual a este último órgano haremos más mención.

Los tres principales tipos de diabetes:

-Diabetes tipo 1

-Diabetes tipo 2 y diabetes gestacional.

La diabetes de tipo 1 (también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia) se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes de tipo 1 y no se puede prevenir con el conocimiento actual.

Sus síntomas consisten entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio.

La DM de tipo 2 (también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta) se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Este tipo representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física.

Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse solo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones.

La diabetes gestacional, que es el tercer tipo que mencione, aparece durante el embarazo, puede conducir a graves riesgos para la salud de la madre y su bebé, aumentar el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 más tarde en la vida.

Los criterios establecidos por la Organización mundial de la salud (OMS) y la Federación Internacional de la Diabetes (FID) nos mencionan los siguientes parámetros:

- Tolerancia anormal a la glucosa: glucosa plasmática en ayunas $\geq 6,1$ mmol/L (110 mg/dL) y < 7 mmol/L (126 mg/dL), según los criterios de la OMS de 1999. (La Asociación Estadounidense contra la Diabetes ha elegido un valor de corte más bajo, de 5,6 mmol/L o 100 mg/dL).
- Glucosa de ayuno anormal: glucosa plasmática en ayuno $< 7,0$ mmol/L (126 mg/dL) y glucosa plasmática a las 2 horas de haber bebido una solución con 75 g de glucosa $\geq 7,8$ mmol/L (140 mg/dL) a $< 11,1$ mmol/L (200 mg/dL).

La mayoría de los 382 millones de personas con diabetes tiene entre 40 y 59 años, y el 80% de ellas vive en países de ingresos medios y bajos. Todos los tipos de diabetes aumentan, en particular la diabetes tipo 2, las personas con diabetes corren el riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud que pueden provocar discapacidad o la muerte. Los constantemente altos niveles de glucosa en sangre pueden conducir a enfermedades graves que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. Las personas con diabetes también tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones.

Algunos síntomas que se presentan son sed, cansancio, visión borrosa, ganas de ir al baño con frecuencia y hasta cierto punto náuseas, debilidad, confusión, dolor de cabeza, presión alta por mencionar a algunos.

El mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre, presión arterial y colesterol puede ayudar a retrasar o prevenir las complicaciones de la diabetes; sin duda las personas con esta enfermedad requieren un seguimiento regular.

1.2. Relación Diabetes Mellitus con daño neuronal.

Si bien la diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que afecta drásticamente varias partes vitales del ser humano, nos enfocaremos en el cerebro que es la parte fundamental de este trabajo. La DM sobresale por su creciente incidencia y prevalencia, y por asociarse con una elevada morbilidad y mortalidad como ya se mencionó a causa de las complicaciones que presentan en su curso.

Las enfermedades cerebrovasculares agudas (ictus, stroke, apoplejía, accidente cerebrovascular agudo) son definidas por la OMS como signos de alteración focal (o global) de la función cerebral de desarrollo rápido, con síntomas de 24 horas o más de duración, o muerte, sin otra causa aparente que la vascular; aunque la glucosa es un nutriente esencial del cerebro, muchos trabajos en humanos y experimentales sugieren que la hiperglucemia aumenta el daño cerebral isquémico agudo.

Todas las enfermedades anteriores son sinónimos de una enfermedad cerebrovascular, donde se produce un trastorno brusco de la circulación cerebral alterando alguna función del cerebro, solo que cada una depende de un lugar específico donde se lleva a cabo.

La hiperglucemia que se produce durante la isquemia cerebral aguda produce daño por aumento de la acidosis tisular local, aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y el riesgo de transformación hemorrágica del infarto. La hiperglucemia se asocia con edema y aumento del tamaño del infarto, junto a disminución del flujo sanguíneo cerebral y la reserva cerebrovascular, la isquemia conduce a enlentecimiento del metabolismo oxidativo de la glucosa y un incremento de la glucólisis anaerobia, que resulta en un aumento de la concentración de ácido láctico. A medida que disminuye el pH intracelular la célula muere o se vuelve disfuncional. La hiperglucemia exagera estos cambios. La evidencia experimental sugiere que la hiperglucemia puede incrementar la producción de lactato por dos mecanismos:

- a) Directo en cerebros con isquemia severa por aumento de la glucosa disponible.
- b) Indirecto en caso de isquemia cerebral incompleta por inhibición de la respiración mitocondrial y oxidación de la glucosa. El aumento de lactato en el área de penumbra isquémica conduce a una evolución desfavorable.

Por lo tanto podemos mencionar que la hiperglucemia no solo es una respuesta de estrés si no que produce un daño a nivel neurológico y que en muchos casos predice la evolución de factores como la disminución del flujo sanguíneo cerebral, la isquemia que nos lleva a la disminución del metabolismo oxidativo de la glucosa y aumento de la concentración de ácido láctico provocando el descenso del pH intracelular y por consiguiente trastornos, daños o muerte celular.

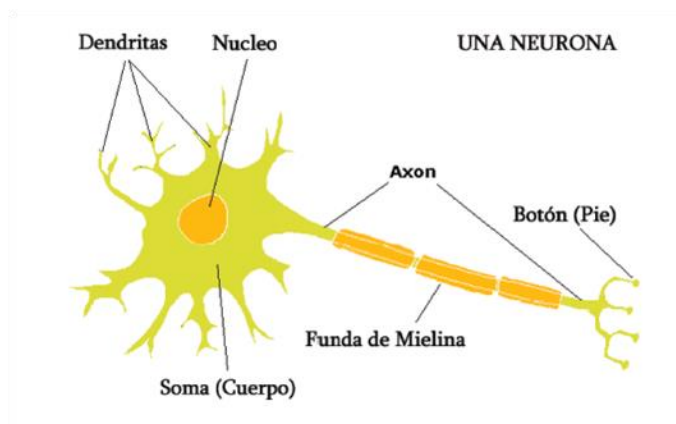
Si lo relacionamos con el deterioro de una función vital o muerte de función neuronal podemos atribuir el siguiente termino; neurodegeneración que se le atribuye a un grupo de enfermedades que afectan al Sistema Nervioso Central (SNC) de diferente origen, pueden ser por deficiencias metabólicas, heredadas, tóxicas entre otras, en donde hay muerte neuronal progresiva causando alteraciones en las funciones mentales.

El concepto de neurodegeneración implica defectos en la neurona que pueden conducir a su muerte, es la acumulación de agregados de proteínas deficientemente plegadas que dan lugar a daño oxidativo e inflamatorio que concluye con la muerte neuronal.

De todas las enfermedades neurodegenerativas, cuya prevalencia aumenta con la edad, las más comunes son las que conllevan la aparición de demencia, entendiéndose por demencia, según el *Oxford Dictionary*, “la pérdida de capacidad intelectual que da lugar a un menoscabo de las funciones ocupacionales o sociales”, algunas de ellas por mencionar: Parkinson, Alzheimer, Esclerosis lateral amiotrófica (ELA), Encefalopatías Espongiformes, Huntington, Ataxias entre otras.

1.3. Síndrome Metabólico, neurotrofinas, plasticidad neuronal, daño cognitivo, aprendizaje y memoria.

Los términos de “plasticidad neuronal y neurotrofinas” son de suma importancia dentro de este tema, si bien el primero expresa la capacidad adaptativa del sistema nervioso para minimizar los efectos de las lesiones a través de modificar su propia organización estructural y funcional; adaptación que experimenta el sistema nervioso ante cambios en su medio externo e interno, además puede reflejar la adaptación funcional del cerebro para minimizar los efectos de las lesiones estructurales y funcionales, el segundo que son las neurotrofinas constituyen una familia de péptidos relacionados que regulan el desarrollo, mantenimiento, diferenciación, supervivencia y muerte de las neuronas y otras células del sistema nervioso central y periférico, lo que incluye acciones sobre soma, axones y dendritas.



Se ha relacionado el Síndrome Metabólico como uno de los factores primordiales que contribuyen al daño de este tipo de estructuras, desde el estilo de vida de una persona hasta los factores genéticos ya establecidos, tales como alteraciones estructurales y fisiológicas, dañando mecanismos de reorganización funcional más importantes como el desenmascaramiento, el retoño sináptico, la arborización dendrítica, la inhibición, facilitación y modificación de neurotransmisores, entre otros.

Si bien, gracias a estos el cerebro tiene la capacidad para adaptarse y compensar los efectos de la lesión, aunque sólo sea de forma parcial, siendo mayor en las primeras etapas de vida que en la edad adulta o vejes ya que fisiológicamente el cerebro va perdiendo capacidad en todos los sentidos, uno de ellos el daño cognitivo.

Los cambios cognitivos asociados con la edad se reflejan principalmente en una disminución en la velocidad y en la eficiencia del procesamiento intelectual, originalmente se refería a un déficit de memoria en el contexto de funciones no-amnésicas preservadas pero actualmente el término incluye déficits en otras funciones cognitivas más allá de la memoria.

El aprendizaje y la memoria son los medios principales de adaptación de los seres vivos, con los cuales se superan las modificaciones inciertas del entorno. Estrictamente desde el punto de vista neurofisiológico, se conoce como aprendizaje al proceso que ocurre cuando la experiencia produce cambios en el SNC, estos cambios pueden ser breves (segundos) o duraderos (meses) y se manifiestan en el comportamiento de los organismos; el aprendizaje es el proceso por el cual se adquiere cierta información que ocurre en un preciso momento,

por su parte la memoria es la capacidad que se tiene para almacenar la información que se obtuvo con el aprendizaje y poder evocarla en momentos adecuados; es un fenómeno inferido a partir de los cambios en el SNC provocados por el aprendizaje.

Tanto el aprendizaje como la memoria consiste en la denominada plasticidad neuronal que ya había mencionado anteriormente por lo tanto si esta plasticidad sufre algún daño o alteración en consecuencia la persona se verá afectada drásticamente, hablamos de memoria a largo plazo y memoria a corto plazo.

La memoria a corto plazo es un sistema para almacenar una cantidad limitada de información (generalmente menos de 12 dígitos) durante un corto periodo de tiempo, es una memoria inmediata para los estímulos que acaban de ser percibidos y se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares, en las sinapsis. Ahora, si el estímulo es repetido una y otra vez, esta repetición puede activar mecanismos de plasticidad neuronal produciendo finalmente cambios estructurales en las sinapsis y estos cambios constituyen el soporte físico de la segunda etapa, la memoria a largo plazo, la cual, a diferencia de la primera, es una memoria estable y duradera.

1.4. El hipocampo y el sistema límbico (CA1, CA3 y GD).

El hipocampo, del latín hippocampus (que a su vez procede del griego hippos que significa caballo), es un núcleo cerebral dividido en tres áreas CA1, CA2 y CA3 (las siglas CA hacen referencia a el término Cornu Ammonis, “asta de Amón” o “asta de carnero”, que fueron algunos de los primeros términos dados por algunos investigadores al hipocampo basados en la apariencia intraventricular de este núcleo cerebral), estas áreas forman al hipocampo propiamente dicho; mientras que el hipocampo en conjunto con el giro dentado (DG) y el subiculum (Sub) dan origen a la formación hipocampal.

Las neuronas del hipocampo son neuronas piramidales glutamatérgicas, mientras que las del DG son neuronas granulares; la información entra por la corteza entorrinal (EC) y de ahí llega al DG, las neuronas del DG se comunican con CA3 a través de las fibras musgosas (MF) y CA3 comunica con CA1 a través de las colaterales de Schaffer (SC), CA1 manda su información al Sub, y para completar el circuito el Sub manda la información hacia la salida de la EC.

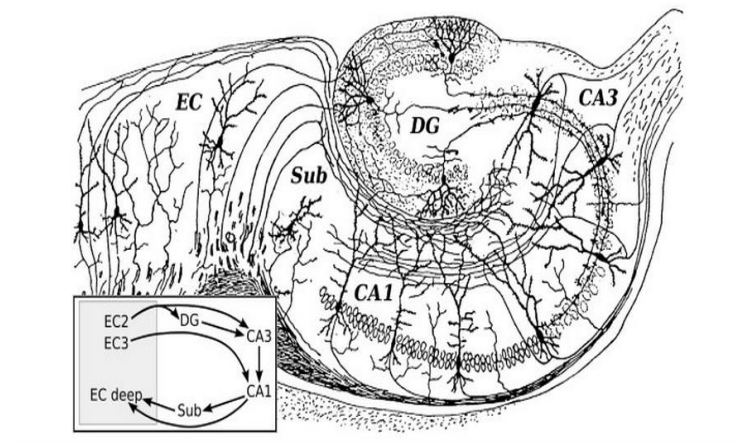


Figura 3. Imagen representativa del cerebro donde se muestra la región de hipocampo, (CA1, CA3 y GD).

La transmisión sináptica excitatoria en el hipocampo es principalmente de tipo glutamatérgica y, por tanto, el glutamato junto con sus receptores tiene un papel fundamental en el mantenimiento y en la regulación de las sinapsis que se llevan a cabo en este núcleo.

Definiendo a la sinapsis como la relación funcional de contacto entre las terminaciones de las células nerviosas, a través de una descarga producida en la membrana emisora o pre-sináptica, que viaja por el axón llegando al final donde se producirá la transmisión del impulso nervioso.

Actualmente se ha observado que los receptores a glutamato tienen una función importante precisamente en la modulación de la fuerza sináptica así como en el desarrollo de las neuronas, en la plasticidad neuronal, y en la neurodegeneración.

1.5. Dietas hipercalóricas como inductores del Síndrome Metabólico en animales.

Enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes y la hipertensión, junto con el síndrome metabólico, están causando cada vez más insuficiencia renal crónica. Para la comprensión de las vías de señalización y mecanismos moleculares que las involucran, la investigación en modelos de roedores que imiten los cambios observados en los seres humanos es esencial; uno de los principales criterios es que los modelos de roedores inicien todos los signos descritos en los seres humanos con síndrome metabólico, especialmente disglucemia y dislipemia.

La exposición y consumo crónico de una dieta hipercalórica propicia cambios citoarquitectónicos, no solo a nivel cerebral, como es el caso de muerte neuronal, pérdida de funciones, alteraciones de memoria y aprendizaje y posteriormente la adquisición de enfermedades crónicas, si no también diferentes órganos como son el riñón uno de los más afectados en estos procesos y el hígado.

La malnutrición en todas sus formas, deficiencias de nutrientes, sobrepeso y obesidad impone un alto costo económico y social en el mundo. El desequilibrio energético debido al excesivo consumo calórico en relación al gasto energético, reflejo del sedentarismo y falta de actividad física inducen el aumento de la masa adipocitaria a través de mecanismos de hipertrofia e hiperplasia del adipocito, la cual es la principal explicación del desarrollo de obesidad.

El tejido adiposo constituye uno de los órganos clave en la homeostasis energética, evidencias recientes demuestran que el tejido adiposo -incluyendo preadipocitos, adipocitos (blanco y café) y tejido estromal- desempeña un papel central en la homeostasis energética; siendo capaz de regular sus propias características funcionales y morfológicas de acuerdo con las condiciones fisiológicas o patológicas predominantes, en la actualidad el tejido adiposo se considera como un órgano con actividad tanto autócrina, parácrina y endocrina, la cual regula la homeostasis de adipocinas pro y anti-inflamatorias que contribuyen a la inflamación asociada con la obesidad.

Actualmente en la obesidad los ácidos grasos libres (AGL) provenientes de la lipólisis en condiciones de desequilibrio energético e inflamación son liberados por el adipocito, e interfieren en la señalización intracelular desencadenada por la insulina y con el metabolismo de lípidos y carbohidratos por lo que se consideran causa y consecuencia del síndrome metabólico (SM), la resistencia a la insulina (RI), la hiperinsulinemia compensatoria y la diabetes mellitus tipo 2. La ocurrencia de enfermedades metabólicas en humanos hace urgente la necesidad de estudios para el entendimiento de sus causas, los mecanismos de progresión, los métodos de diagnóstico e intervenciones terapéuticas de muchas patologías humanas.

Estos estudios requieren modelos animales viables que simulen en gran parte los aspectos primordiales que se observan en las enfermedades humanas; así, enfermedades metabólicas crónicas son replicadas en modelos de roedores, al demostrarse la existencia de correlación con los signos presentes en enfermedades humanas como obesidad, hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y recientemente, dislipidemias, hígado graso no alcohólico, disfunción renal, resistencia a la insulina, disglucemia y síndrome metabólico. Los modelos más comunes reportados en la literatura son a base de aloxano y estreptozotocina.

Químicamente producen hígado graso, inflamación, hiperglicemia, pero contrariamente al síndrome metabólico se observa hipoinsulinemia y no hay ganancia de peso; semejándose más a la diabetes mellitus tipo 1. Se han desarrollado mediante dosis bajas de estreptozotocina modelos con hiperglicemia, decremento de HDL, pero sin alteraciones en otros lípidos, ausencia de cambios en las enzimas oxidativas y sin el desarrollo de hipertensión. Por lo que la evidencia científica es insuficiente para afirmar que la estreptozotocina es inductora de síndrome metabólico.

Así mismo, se han desarrollado modelos genéticos para el estudio de la obesidad y la diabetes incluyen a los ratones db/db (C57L/Ks) y ob/ob, ratas Zucker, Otsuka Long-Evans Tokushima, Fatty; estos modelos son útiles en la evaluación de los mecanismos moleculares específicos que pueden estar implicados en el curso temporal de las patologías, ya que presentan desarrollo de obesidad, hiperglicemias con resistencia a insulina y dislipidemias con hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y reducción de la relación HDL/LDL.

2.-JUSTIFICACIÓN

Estimaciones recientes de la FAO (Food and Agricultural Organization) indican que 868 millones de personas están subnutridas calóricamente, así mismo 1.4 mil millones de personas tienen sobrepeso, de los cuales 500 millones son obesos. Según datos de la encuesta nacional de salud y nutrición 2014 (ENSANUT 2012) en México la prevalencia combinada de sobrepeso-obesidad ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) es mayor en las mujeres (73.0%) que en los hombres (69.4%). Por lo que actualmente es indispensable considerar al excesivo consumo calórico y consecuentemente la obesidad como factores predisponentes de patologías crónico degenerativas.

El presente trabajo proporciona la información necesaria para comprender el impacto del Síndrome Metabólico sobre los cambios a nivel de cerebro como son la morfología neuronal; ocasionando procesos de neurodegeneración y en consecuencia daño cognitivo.

Siendo esto una evidencia más de la prevención de tratamiento del SM que afecta a todo el mundo, primordialmente a nuestra población mexicana.

3. OBJETIVOS

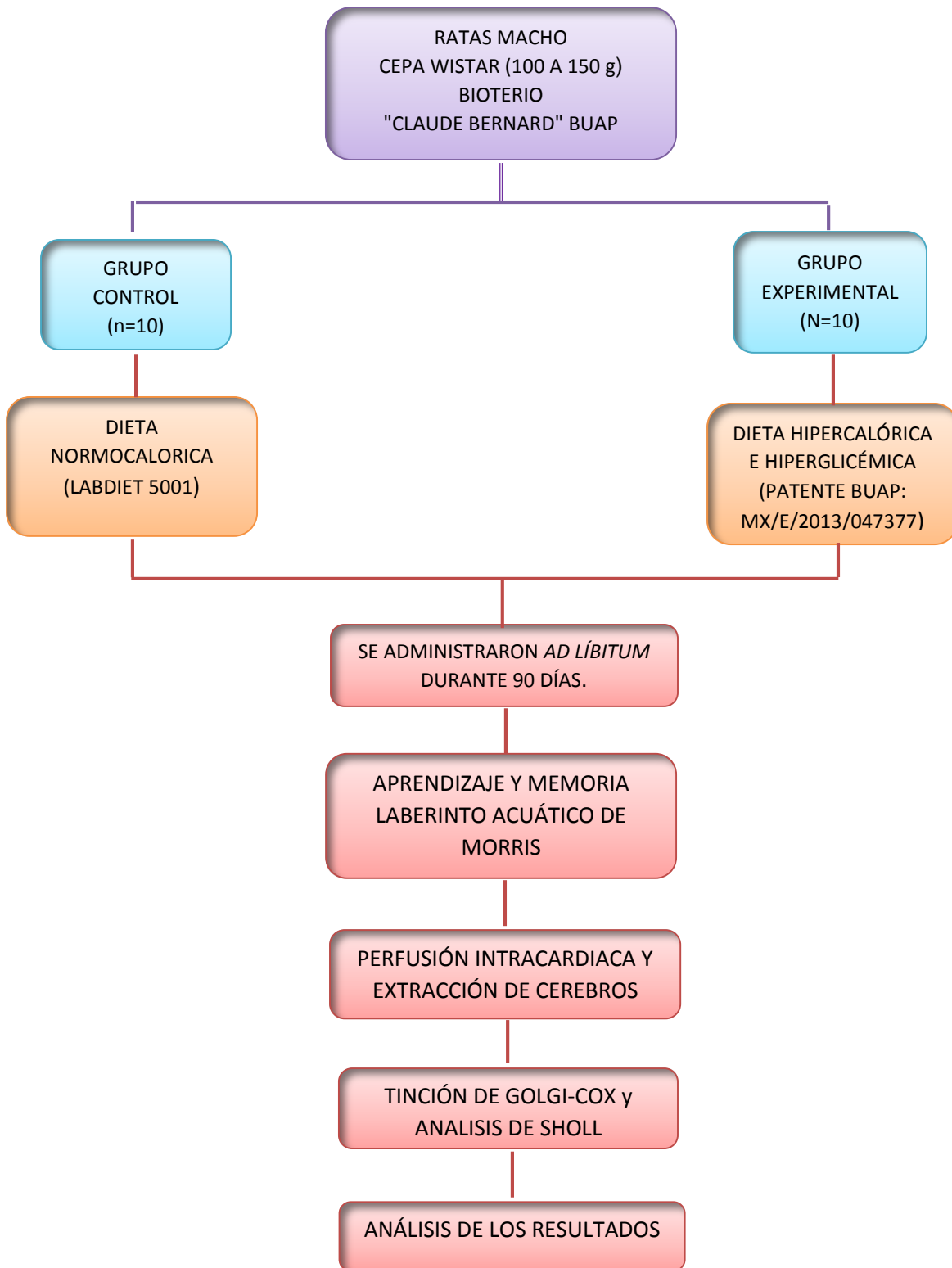
3.1 Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la administración de una dieta hipercalórica sobre la memoria espacial y morfología neuronal de hipocampo en rata.

3.2 Objetivos particulares:

- Analizar el efecto de la administración de una dieta hipercalórica sobre la memoria espacial en rata.
- Evaluar el efecto de la administración de una dieta hipercalórica sobre la morfología neuronal de hipocampo en rata.
- Estudiar el efecto de la administración de una dieta hipercalórica sobre la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo en rata.

4.- DIAGRAMA METODOLÓGICO



5.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Animales de laboratorio:

Se utilizarán ratas macho de la cepa Wistar (100 a 150 gramo), los cuales se mantendrán en jaulas con libre acceso de agua y alimento, a una temperatura de 24°C, 50% de humedad y un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas. Todos los procedimientos de manejo y disección de los animales, serán sujetos a los protocolos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999. Los animales se dividirán en dos grupos: control (n=10) y problema (n=10). El grupo control se mantendrá con dieta balanceada de aporte energético (LabDiet 5001) y el grupo problema se expondrá a una dieta hipercalórica e hiperglicémica (Patente BUAP: MX/E/2013/047377). Ambas dietas se administrarán *ad libitum* durante 90 días, tiempo necesario para inducir el síndrome metabólico (Flores et al. 2014).

5.2. Determinación de los parámetros bioquímicos para valorar la inducción del síndrome metabólico:

A los animales del grupo control (n=10) y problema (n=10) se les practicarán las determinaciones séricas en condiciones de ayuno para evaluar la glucosa, insulina, lípidos totales, triglicéridos, ácidos grasos libres a los 0, 30, 60 y 90 días de la administración de las dietas respectivas. Mediante técnicas espectrofotométricas (Flores et al. 2014).

5.3. Zometría

Estudia las formas de los animales mediante mediciones corporales concretas que nos permiten cuantificar la conformación corporal; para esto el peso, porcentaje de grasa, perímetro abdominal y el tamaño de las ratas se monitorizaron semanalmente.

El peso se midió usando una balanza digital (Torrey, modelo: LPCR -20 /40, Querétaro, México). La talla de cada animal se obtuvo midiendo la longitud entre la base de la cola a la

punta de la nariz. El perímetro abdominal se estimó mediante la zona de membrana como el límite superior y el pliegue de las piernas como el límite inferior.

El índice de masa corporal (IMC) se calculó utilizando la fórmula: peso / tamaño², y el porcentaje de grasa se calculó de acuerdo a índice de Lee para los modelos de roedores, utilizando la siguiente fórmula:

Porcentaje de grasa corporal = (peso^(0.33)) X 100 (Rogers, Webb , 1980).

5.4. Memoria espacial, Laberinto de Agua de Morris.

El laberinto de agua de Morris (LAM) se ejecuta como descrito por Morris (1984). La piscina se encuentra en una gran sala de ensayo en la que existen varias señales extrañas al laberinto. El aparato consistía en una circular Piscina de agua (140 cm de diámetro y 80 cm de alto) que se llenaron con agua hasta una altura de 42 cm en 23.6 ± 0.288°C y teñido con 0,01% de óxido de titanio blanco (TiO₂).

La piscina se dividió en cuatro cuadrantes, tomando cuatro puntos designados como posiciones de partida (N, S, E o W). Un diámetro de la plataforma (20 cm y 40 cm de altura) estaba situado en una posición constante en el medio de un cuadrante, equidistantes del centro y de la borde de la piscina, y fue sumergida 2 cm por debajo de la superficie del agua. En cada prueba, la rata se colocó en el agua frente a la pared del tanque en una de los cuatro posibles lugares de partida. El orden de partida fue variada cada día y cualquier secuencia dada no se repitió en días fase de adquisición. Las ratas recibieron 4 ensayos / día, con un 50 min intervalo entre ensayos.

Este procedimiento se repitió para 5 días de entrenamiento. A las ratas se les permitió buscar la plataforma de 90 y fueron gentilmente guiadas a ella si no alcanzan el objetivo de su propio. Si una rata encontró la plataforma se dejó permanecer allí durante 15s y luego fue devuelto a su jaula. Si las ratas fueron incapaces de encontrar la plataforma dentro de los 90, la sesión de entrenamiento se terminó y se asignó una puntuación máxima de 90.

Dos variables se midieron: el tiempo para encontrar la plataforma (o el tiempo para cruzar la localización de la plataforma) y el número de cruces del cuadrante plataforma.

Con la plataforma elimina, la prueba de memoria era hecho 10 días después de la formación, con todos los animales recibir sólo un ensayo, como se describió anteriormente. Las variables evaluadas fueron los primeros, la latencia en el cruce donde había sido localizado y la plataforma en segundo lugar, el número de cruces del cuadrante objetivo de la plataforma. Los ensayos se registraron por una cámara de vídeo montada por encima del centro de la piscina (Sharp VL-WD450 U).

5.5. Extracción de cerebros.

Se anestesió al animal con una sobredosis de pentobarbital sódico (75 mg/Kg, ip). Se realizó la perfusión intracardiaca con solución salina 0.9%. Se abrió la cavidad torácica para exponer el corazón y se administró por medio del ventrículo izquierdo y se cortó la arteria aorta o la aurícula derecha para retirar los eritrocitos del cerebro. Posteriormente se realizó la extracción de los cerebros (Ver figura No.4)

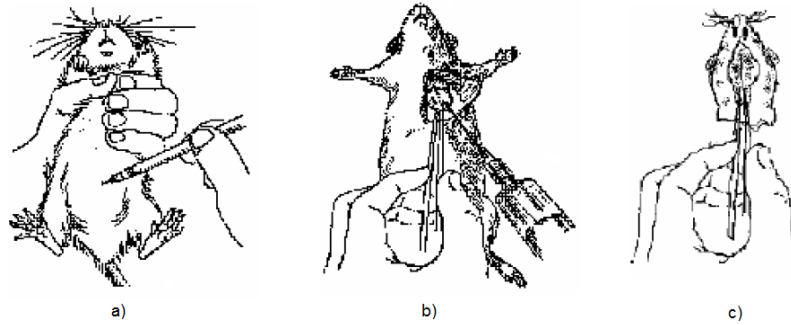


Figura 4. Perfusión y Extracción de cerebros.

5.6. Método de Golgi-Cox

El método de Golgi-Cox permite la impregnación de células nerviosas y sus prolongaciones, así como la visualización constante de las espinas dendríticas (Kolbs et al, 1998). Los cerebros se mantuvieron en solución de Golgi-Cox por 15 días en total oscuridad. Después de la tinción los cerebros fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% por 5 días para dar flexibilidad al tejido y evitar fracturas. Se realizaron cortes coronales de 200 μm de espesor con la ayuda de un micrótopo, colocándolas en portaobjetos recubiertas con gelatina al 2%, posteriormente se pasaron al revelado que consta de:

1. Sumergir las laminillas en hidróxido de amonio (30 min)
2. Lavado con agua destilada (1 min)
3. Sumergir las laminillas en la solución Kodak Fix en total oscuridad (30 min)
4. Lavado con agua destilada (1 min)
5. Deshidratación mediante baños sucesivos de alcohol
 - ⊙ Alcohol al 75% (1 min)
 - ⊙ Alcohol al 90% (1 min)
 - ⊙ Alcohol al 100% (5 min)
 - ⊙ Alcohol al 100% (5 min)
6. Aclarado con xileno (15 min)

Las laminillas se montaron con resina sintética para la conservación de los cortes.

5.7. Localización e identificación de Neuronas.

Se procedió a identificar la región a analizar y posteriormente las neuronas a trazar. Los criterios para la identificación de las neuronas son forma del soma piramidal, impregnación completa de las neuronas, neuronas aisladas y completas, la presencia de al menos tres ejes principales dendríticas basilar. Se trazaron 10 neuronas por cada hemisferio por región por animal además se trazaron las espinas dendríticas en un segmento de 30 μm de longitud en su porción distal con una cámara lucida con un aumento de 40x y 100 x respectivamente (DMLS, Leica Microscopio) (Ver figura No. 5) (Kolb, 1998, Silva et al, 2003).



Figura 5. Ilustración de trazado de neuronas mediante la cámara lucida (Kolbs *et al*, 1998).

Las zonas en las que nos concentramos a analizar fueron CA1, CA3 y GD para cada neurona, tanto para el grupo control, así como para el grupo experimental; posterior a esto se procedió a realizar la tipificación de espinas, para la cual se hizo el conteo de las espinas dendríticas distales (10 μm de la porción más distal de la dendrita) y con el objetivo 100x se observó la laminilla, para la evaluación de la densidad de espinas dendríticas.

5.8. Análisis morfológico de Sholl

El análisis morfológico de Sholl consistió en iluminar cada orden de las dendritas con diferente color posteriormente se colocó una plantilla de círculos concéntricos sobre el soma de la neurona trazada y se cuantificó el número de orden de cada dendrita a partir del cuerpo celular se contó el número de intersecciones de cada círculo (Ver figura No 6). La densidad de espinas dendríticas se estimó mediante un trazado de 10 μm de longitud de la dendrita más distal (Kolb y cols., 1998; Silva y cols., 2003).

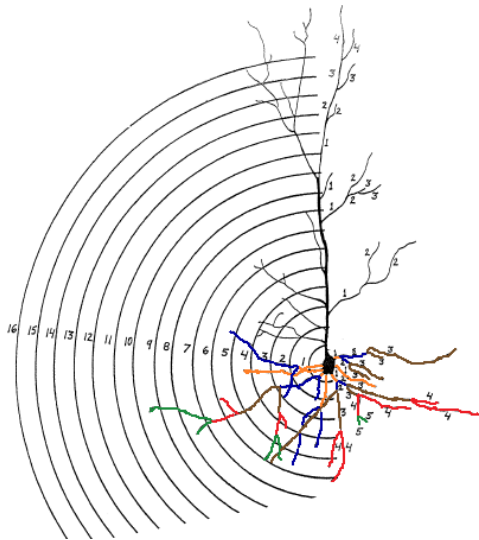


Figura 6. Plantilla de círculos concéntricos para el análisis de Sholl (Kolbs et al, 1998).

Los datos obtenidos de la prueba de aprendizaje y el análisis morfológico se graficaron como el promedio \pm el ESM. El análisis estadístico a realizar será una ANOVA de 2 vías (aprendizaje y memoria) y una *t-student* para el análisis morfológico.

6.- RESULTADOS

Para demostrar que la administración de una dieta hipercalórica genera el desarrollo de síndrome metabólico en ratas durante un periodo de 90 días, se realizaron los parámetros zométricos y bioquímicos a ratas con síndrome metabólico. Los resultados que se obtuvieron muestran que hay un incremento significativo en los parámetros zométricos y bioquímicos respecto al grupo de ratas administradas con una dieta normocalórica. Estos parámetros nos permitieron observar que las ratas estuvieran desarrollando síndrome metabólico con una dieta hipercalórica (Ver figura 7).

Los resultados morfológicos obtenidos por la técnica de Golgi-Cox se realizaron por la cuantificación de un total de 10 neuronas por sujeto experimental en cada región analizada (CA, CA3 y GD) de los dos grupos experimentales. Los parámetros evaluados fueron los siguientes: El número de intersecciones neuronales, el No. de Orden, Longitud Dendrítica Total y las espinas dendríticas.

Parámetros	% calorías	Dieta de alta caloría
	Kcal/g(DNC) Lab-Diet 5001	(HDC) (mx/e/2013/047377)(%)
Zometria		
Peso (g)	341 ± 3.4	407 ± 4.3 **
Altura (cm)	24.4 ± 0.4	24.1 ± 1.1
BMI (g/cm²)	0.93 ± 0.02	1.24 ± 0.02 *
Cuerpo gordo (%)	35.9 ± 0.12	40.0 ± 0.2 *
Perímetro abdominal (cm)	18.4 ± 0.13	19.5 ± 0.07 *
Panel de lípidos (mg / dL)		
Total de lípidos	184 ± 12	283.1 ± 9.8 ***

Triglicéridos	64.4 ± 2.5	98.2 ± 3.5 **
Ácido grasos libres	2.18 ± 0.03	5.02 ± 0.07 ***
Colesterol total	103.1 ± 7.5	98.8 ± 10.5
Panel de carbohidratos		
Lactato mmol/L	4.7 ± 0.7	8.65 ± 1.05 ***
Glucosa en ayunas (mg/dl)	98.7 ± 4.5	150.3 ± 9.3 ***
Insulina en ayunas (µU/mL)	12.5 ± 1.0	24.1 ± 1.8 ***
Insulina 30' (µU/mL)	16.4 ± 1.9	35.7 ± 1.5 ***
Insulina 60' (µU/mL)	11.1 ± 1.0	18.3 ± 1.3 **
Insulina 90' (µU/mL)	6.3 ± 0.5	16.7 ± 1.5 ***
Insulina AUC	1,092	2,232 ***
HOMA-IR	0.51 ± 0.06	1.5 ± 0.13 ***
HOMA-s%	196.1 ± 6.0	66.7 ± 8.2 **
QUICKI	0.46 ± 0.02	0.33 ± 0.004 **

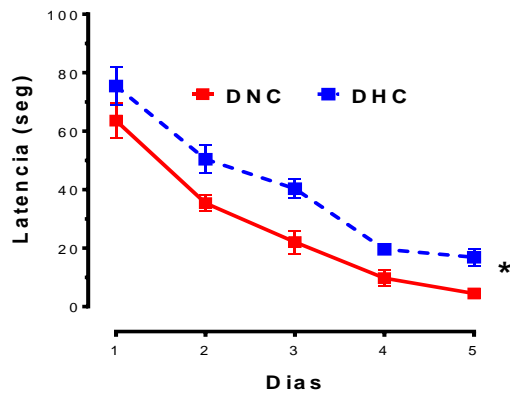
Figura 7. Parámetros zoométricos y bioquímicos de ratas administras con DNC y DHC.

Las primeras graficas estándar, nos muestran la comparación de la dieta normocalórica con respecto a la dieta hipercalórica; con respecto a los días de latencia, el número de cruces por el cuadrante blanco y la latencia del primer cruce en el mismo cuadrante blanco.

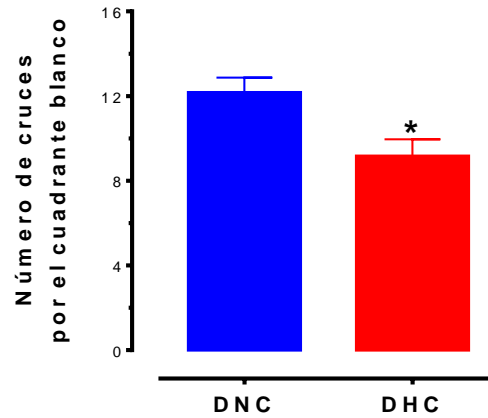
- A) En la dieta normocalórica (DNC), el tiempo que transcurre entre el estímulo y el tiempo de respuesta es inferior alrededor de un 20% a la dieta hipercalórica (DHC) a las cuales las ratas fueron sometidas, lo cual nos dicen que la ingesta de carbohidratos en exceso alarga el periodo de tiempo ante un estímulo. (Figura 8A).
- B) Con respecto al ensayo de Laberinto de Agua de Morris, en la ingesta de la dieta hipercalórica (DHC) el número de cruces por el cuadrante blanco fue mucho menor a la ingesta de una dieta normocalórica (DNC), por lo tanto la memoria espacial en estas ratas se vio afectada. (Figura 8B).

C) Por consiguiente en estas gráficas, el tiempo de latencia es mucho mayor en ratas administradas con una dieta hipercalórica (DHC). (Figura 8C).

A)



B)



C)

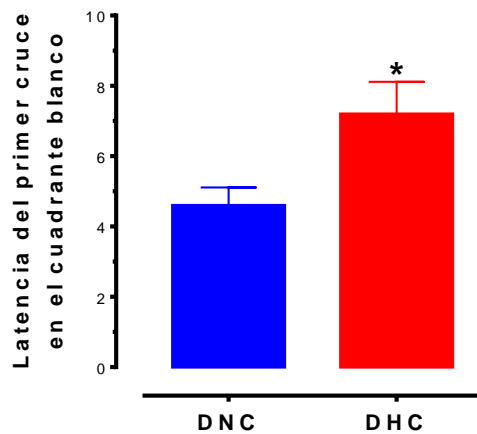


Figura 8. Efecto de la dieta hipercalórica sobre el aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. En A) Se muestra el tiempo de latencia en llegar a la plataforma. En B) se muestra el número de cruces por el cuadrante donde se localiza la plataforma y en C) el tiempo de latencia en llegar al cuadrante donde se localiza la plataforma. Los datos graficados, representa la Media \pm el error estándar de la media. Anova de dos vías * $p < 0.05$.

6.1 Efecto de la ingesta de DHC con respecto a una DNC sobre la morfología neuronal de CA1 en rata.

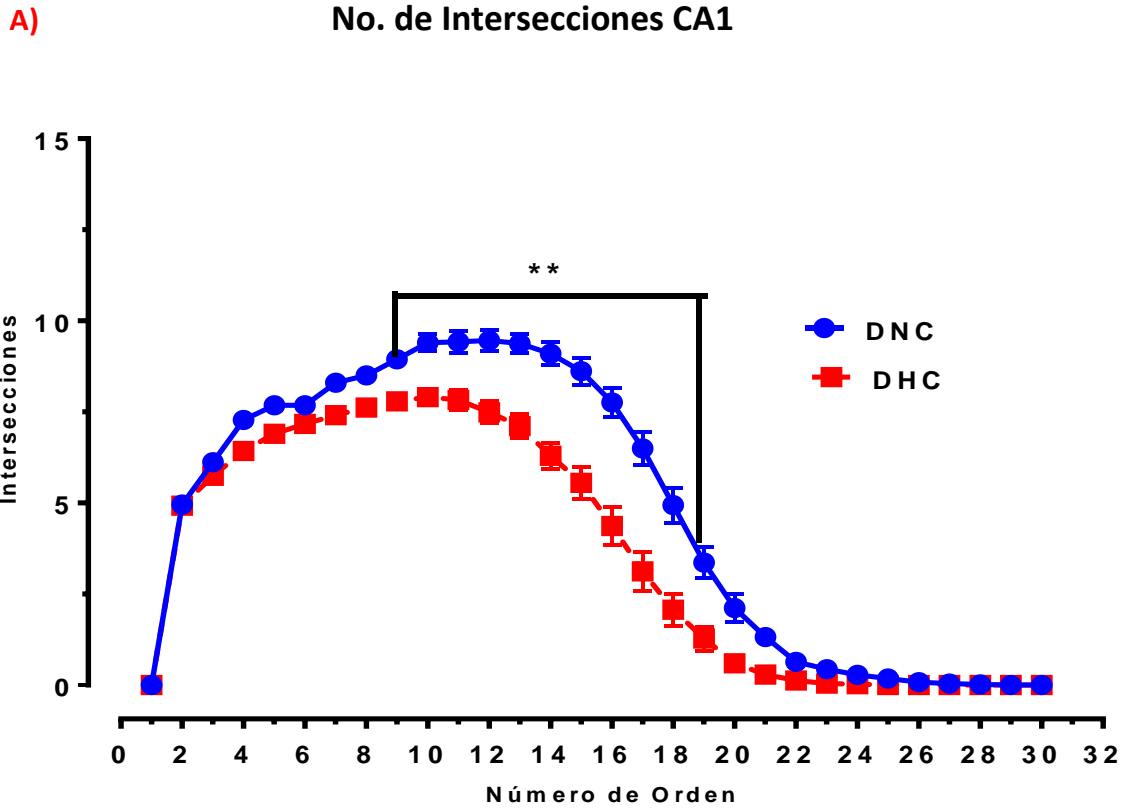


Figura 9. Con respecto al número de intersecciones en la DHC y como se muestra en la gráfica desde el número de orden 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 disminuyeron de forma significativa; siendo estas menores de 10 intersecciones por neurona a comparación de la DNC que se maneja de inicio. Se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey ($P < 0.01$).

B)

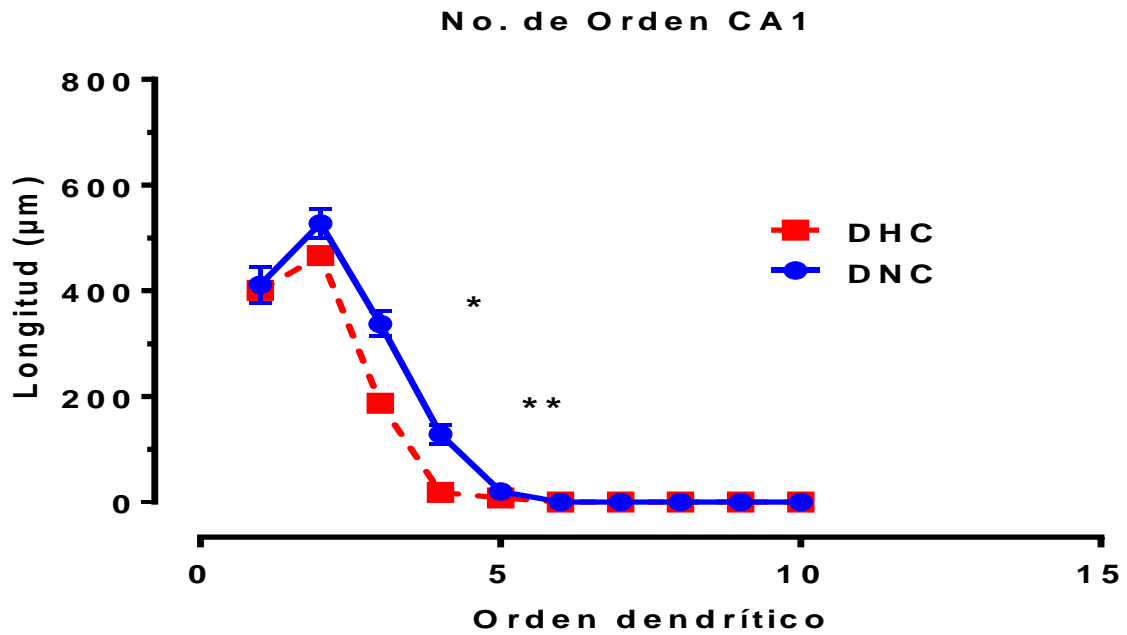


Figura 10. En el No. de Orden también se demuestra que la DHC tuvo una disminución no tan específica como la pasada pero si significativa para la interpretación de resultados; donde el orden dendrítico va de 2, 3, 4 y 5. Se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey ($P < 0.05$), ($P < 0.01$).

c)

Longitud Dendrítica Total CA1

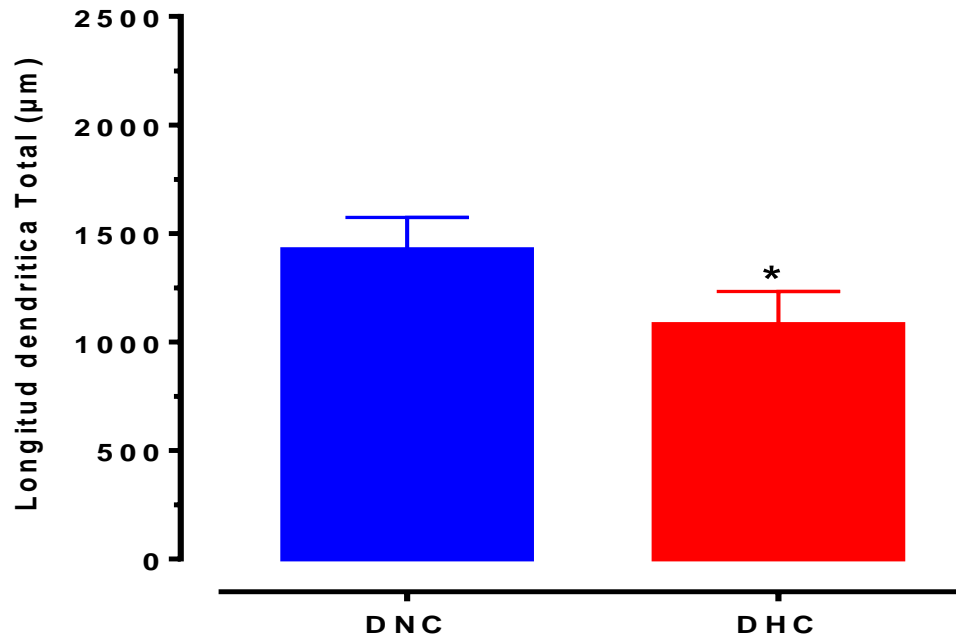


Figura 11. En la longitud dendrítica total se observa una disminución (µm) de la dieta hipercalórica (DHC), con respecto a la dieta normo calórica (DNC). Se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey ($P < 0.05$).

D)

Espinas dendríticas CA1

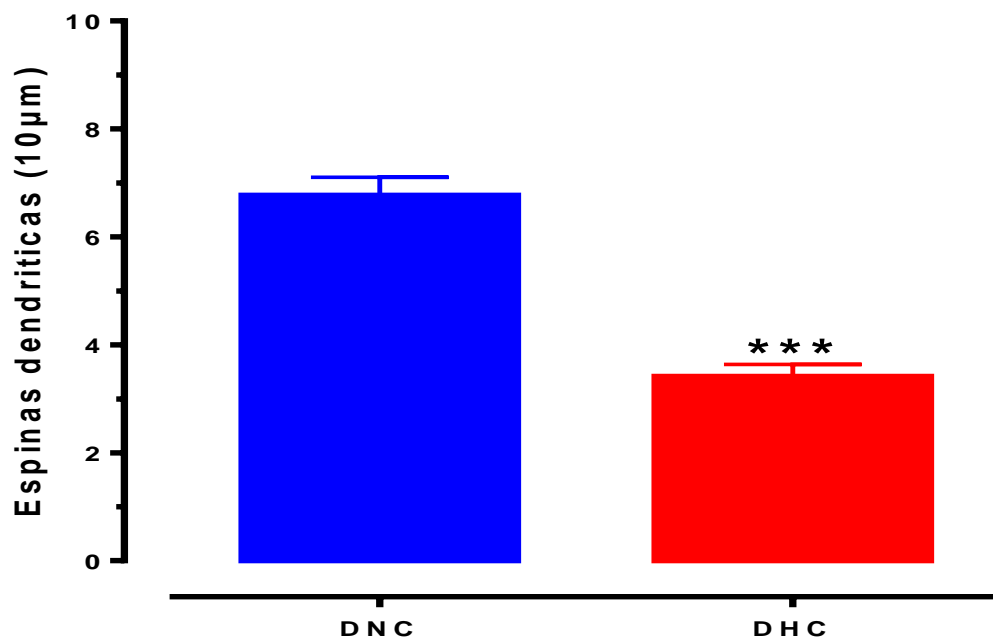


Figura 12. En el caso de las espinas dendríticas fue el mismo caso y de los más notables ya que la dieta hipercalórica también disminuyó casi a la mitad de los valores de la DNC. Se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey ($P < 0.001$).

6.2 Efecto de la ingesta de DHC con respecto a una DNC sobre la morfología neuronal de CA3 en rata.

A)

No. de Intersecciones CA3

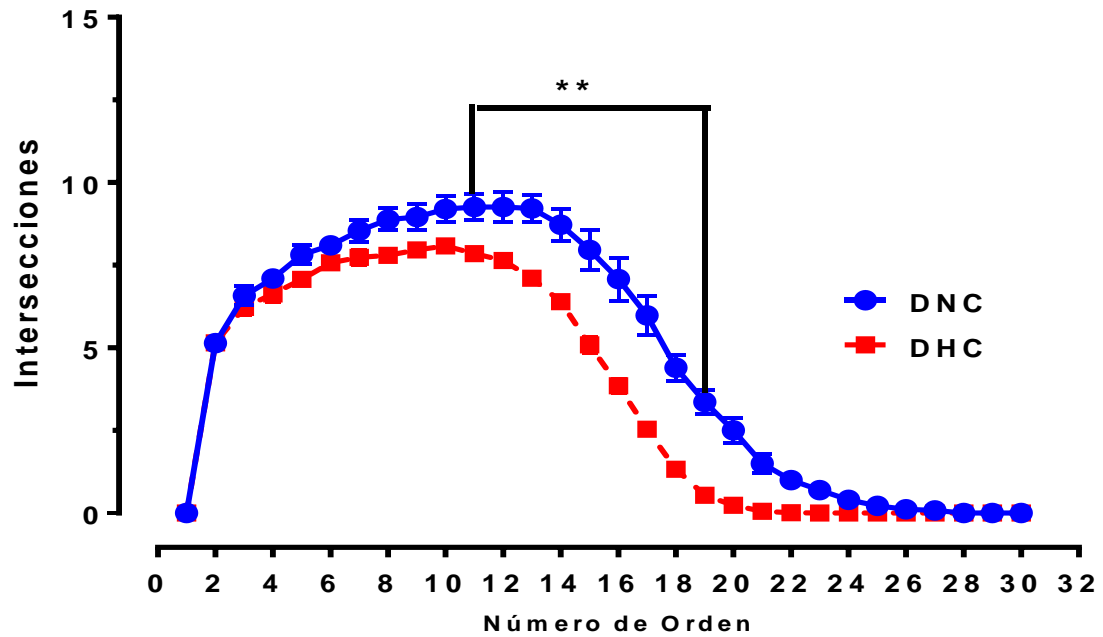


Figura 13. Como se puede observar el número de intersecciones de la dieta hipercalórica (DHC), en la región de CA3 también disminuyó significativamente con respecto a la dieta normo calórica (DNC) que es nuestra dieta control, iniciando en el punto 2 hasta el punto 24, también se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey $P < 0.01$.

B)

No. de Orden CA3

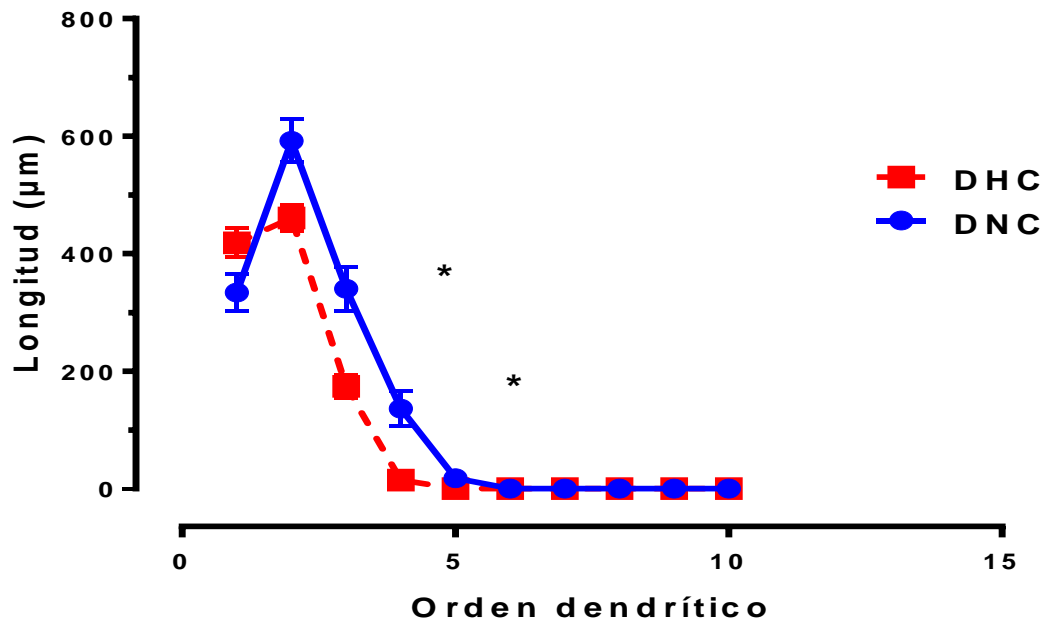


Figura 14. En el análisis estadístico del No. de Orden para la región CA3 se observó que la dieta hipercalórica (DHC) está por debajo de la dieta base (DNC) en los puntos 2, 3 y 4 sin embargo la longitud (μm) para la primera unidad está por arriba de la dieta normo calórica. Se manejan dos medias, así como una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey $P < 0.05$ ($P < 0.05$).

c)

Longitud Dendrítica Total CA3

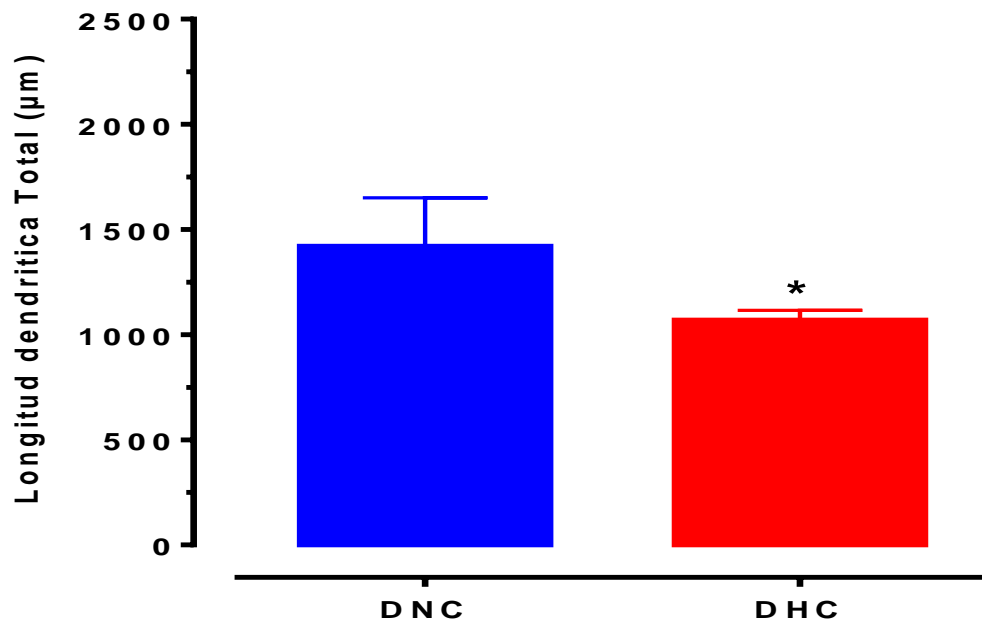


Figura 15. Longitud dendrítica total, los valores indican la relación de esta con el número de orden. La estadística se realizó mediante una ANOVA de dos vías, arrojándonos nuevamente una disminución significativa en la dieta hipercalórica (DHC) inducida hacia las ratas trabajadas a comparación de la dieta normo calórica (DNC). ($P < 0.05$).

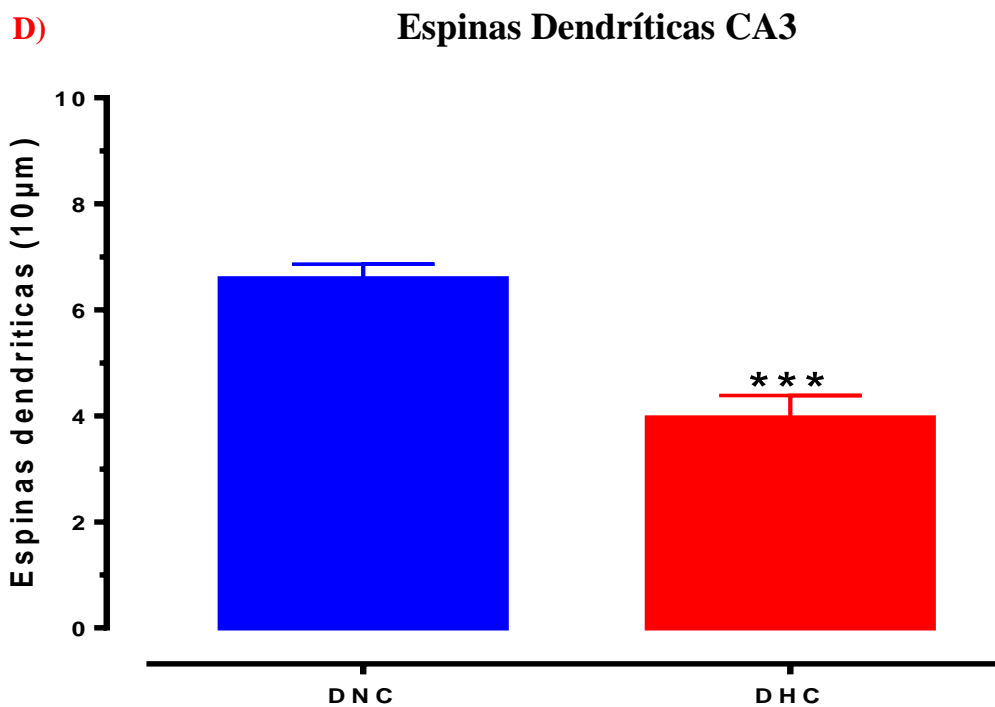


Figura 16. La relación de espinas dendríticas entre el grupo control (DNC) y el grupo de ratas a las cuales administramos (DHC), estadísticamente los valores arrojan una diferencia superior a la de CA1, realizando una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey $P < 0.001$.

6.3 Efecto de la ingesta de DHC con respecto a una DNC sobre la morfología neuronal de GD en rata.

A)

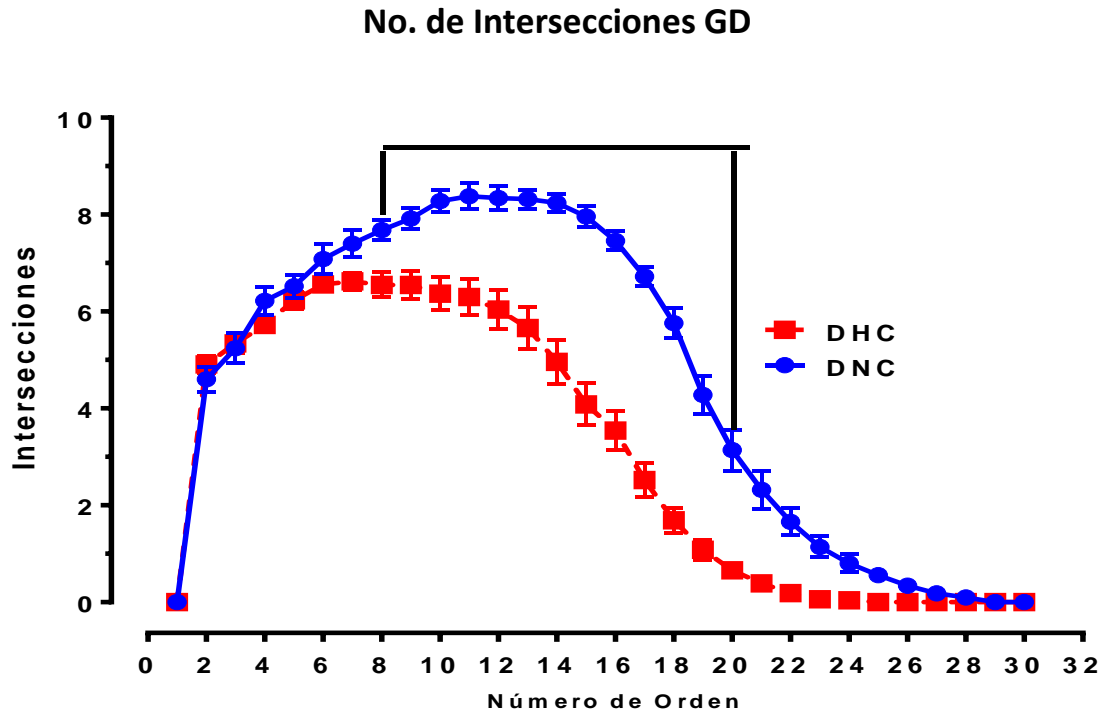


Figura 16. Estadísticamente el número de intersecciones con respecto al número de orden para la región de Giro Dentado al igual que los resultados anteriores en esta también existe una variable comparativa para los dos grupos trabajados, en la dieta hipercalórica se observa la disminución desde el punto 4 hasta el punto 27.

B)

No. de Orden GD

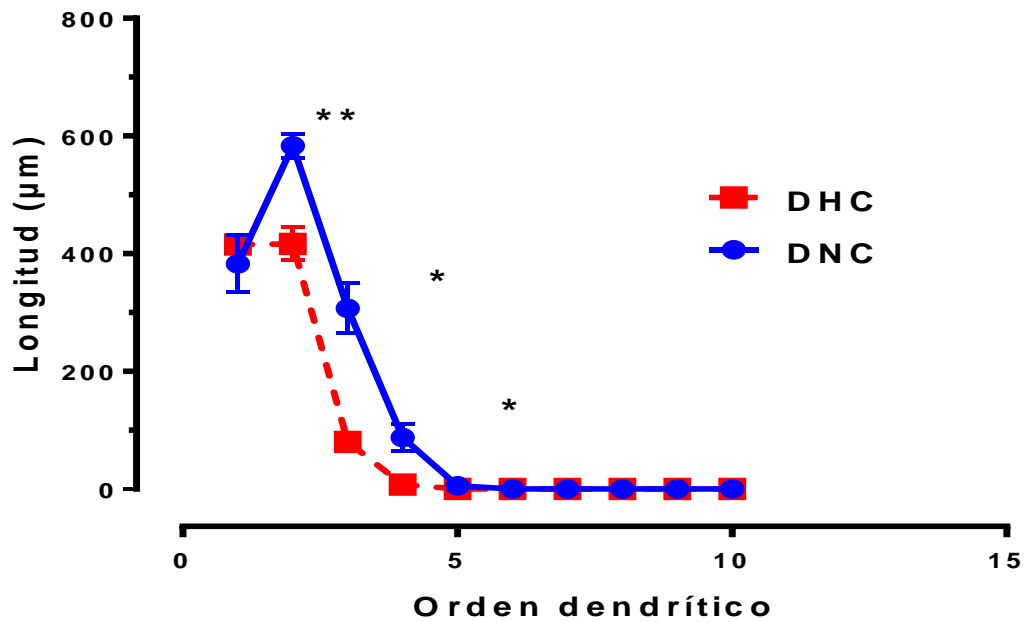


Figura 17. El número de orden con respecto a la longitud (μm) estadísticamente existe también una disminución en la dieta hipercalórica (DHC) con respecto a la dieta normocalórica (DNC), hablando del punto 2, 3 y 4. A comparación de la región CA3 en esta en punto uno se asimilo al grupo estándar. También se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey $P < 0.01$, ($P < 0.05$), ($P < 0.05$).

c)

Longitud Dendrítica Total GD

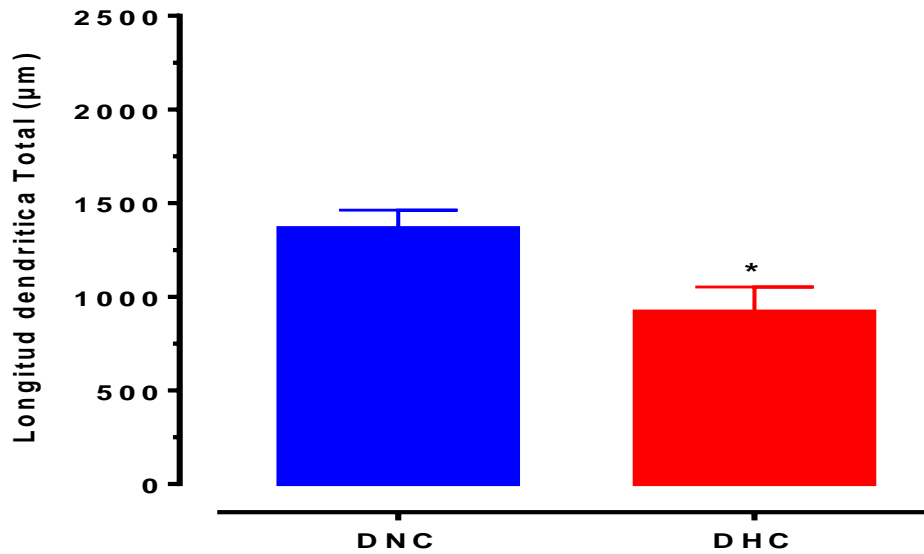


Figura 18. Para la Longitud Dendrítica Total la dieta hipercalórica (DHC) disminuyó a comparación de la dieta normocalórica (DNC) se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey $P < 0.05$.

D)

Espinas Dendríticas GD

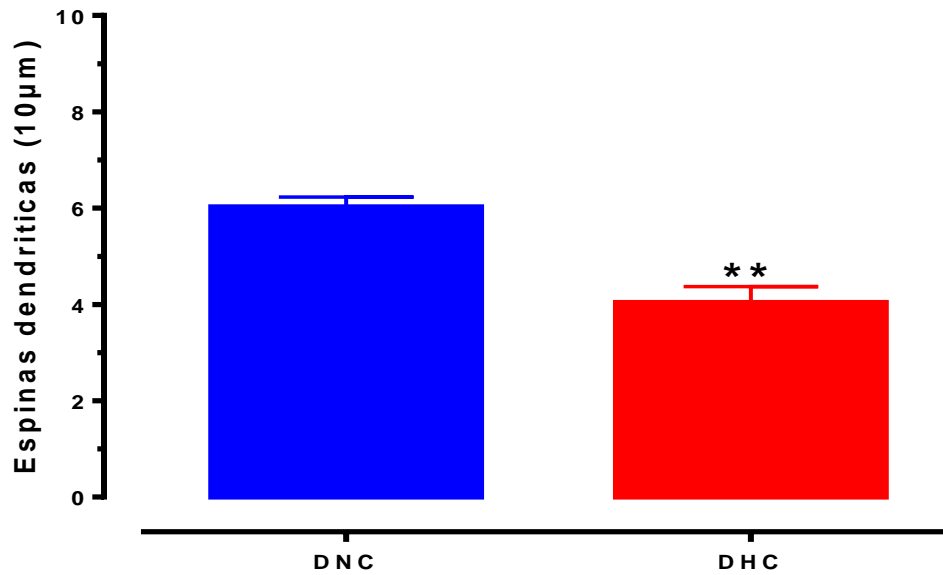


Figura 19. En esta grafica para el análisis de la región de GD, específicamente para espinas dendríticas, en la dieta hipercalórica (DHC) se observa disminución a comparación de la dieta normo calórica (DNC) se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una post hoc de Tuckey $P < 0.01$.

7.-DISCUSIÓN

La investigación realizada en este trabajo tuvo como objetivo estudiar los cambios y alteraciones morfológicas que se presentaron en a nivel cerebral, específicamente en las zonas de hipocampo CA1, CA3 y GD; esto a casusa de la inducción de una dieta hipercalórica y propiciando en el estudio el desarrollo de un síndrome metabólico en ratas que fueron nuestra base de estudio. Como ya se mencionó el Síndrome Metabólico (SM) se caracteriza por diferentes trastornos bioquímicos y fisiológicos, en su etiología influyen factores ambientales así como hábitos alimenticios (sedentarismo). Sin duda la base de este proyecto fue la alimentación y el grado de daño provocado al cambiar el estilo de vida de la rata.

Si bien se ha relacionado el Síndrome Metabólico como uno de los factores primordiales que contribuyen al daño de estructuras neuronales y fisiológicas, dañando mecanismos de reorganización funcional más importantes como el desenmascaramiento, el retoño sináptico, la arborización dendrítica, la inhibición, facilitación y modificación de neurotransmisores.

Se ha reportado que más del 90% de las sinapsis excitatorias se llevan a cabo en las espinas dendríticas, además que a medida que aumenta la superficie sináptica aumentan los contactos sinápticos (Robinson et al, 1999; Kolbs et al, 2010); un aumento en la densidad de espinas dendríticas y en la LDT significa un aumento en la superficie sináptica. Sin embargo con los datos arrojados en la investigación podemos decir que el porcentaje de sinapsis de las ratas inducidas con una dieta hipercalórica es mucho menor que el de una rata con una dieta calórica normal.

Los resultados en hipocampo de una DNC con respecto a la ingesta de DHC nos arrojan que en la zona CA1 existe una disminución de intersecciones neuronales, mientras que para el No. de Orden la disminución también se hizo resaltar en 4 unidades, siendo esta significativa para la interpretación de resultados, así también la longitud dendrítica total disminuyo en una DHC y para el caso para espinas dendríticas los valores fueron más de la media establecida; con respecto a CA3 paso lo mismo se observó una disminución en los 4 factores analizados solo que en el caso de intersecciones neuronales la disminución al igual que CA1 comenzó en el

punto 4 pero se mantuvo en disminución hasta la intersección 24; en el No. de Orden las zonas visibles fueron 2, 3 y 4 la longitud dendrítica total y las espinas dendríticas de igual manera el daño se hizo notable.

Y finalmente para la zona de Giro Dentado (GD) nos damos cuenta que los resultados siguen siendo los mismos pero en diferente escala en este caso para las intersecciones neuronales al igual que CA1 y CA3 comienza a descender en 4 aunque para GD fue más prolongado ya que termina en el punto 27 y por mencionar el No. de Orden, LDT y las espinas dendríticas se relacionan en un 90% con los demás resultados.

Sabiendo que la transmisión sináptica excitatoria en hipocampo es regulada principalmente por receptores a glutamato y que es fundamental para el mantenimiento y la regulación de la sinapsis, podemos decir que en este caso se observó que parte de este proceso no se lleva a cabo en su totalidad por los valores obtenidos y que por lo tanto la fuerza sináptica, el desarrollo de las neuronas, la plasticidad neuronal se ven afectadas y en consecuencia procedentes de una neurodegeneración.

8.-CONCLUSIÓN

El Síndrome Metabólico inducido por una dieta hipercalórica en ratas, provoco una disminución en los estándares valorados (Intersecciones neuronales, No. de Orden, LDT y Espinas dendríticas); lo que nos da a demostrar que efectivamente la ingesta de calorías provoca un cambio, no solo a nivel clínico como ya se mencionó, si no también complicaciones a nivel de cerebro.

En conjunto estos resultados sugieren que una DHC promueve el desarrollo de SM y contribuye al desarrollo de un proceso de neurodegeneración e insuficiencia cognitiva. En este sentido, es importante entender la relación entre la SM y el daño neuronal con el fin de prevenir la aparición de trastornos neurodegenerativos.

9.-BIBLIOGRAFIA

- Vertes RP. (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neurosci* 142: 1-20.
- Tripp G, Wickens JR. (2009) Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* 57: 579-589.
- Ebling, F (2005). The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction*,129, 675-683.
- Shin, L., Liberzon, I (2010).The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35, 169–191
- Robinson TE, Kolb B. (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacol* 47(1):33-46.
- Robinson TE, Kolb B. (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *European Journal on Neuroscience* 11:1598-1604.
- Eikelenboom P, van Gool WA. 2004. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 111:281–294.
- Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña J. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed* 11: 39-60.
- Juarez I, Gratton A, Flores G. 2008. Ontogeny of altered dendritic morphology in the rat prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens following Caesarean delivery and birth anoxia. *J Comp Neurol* 507:1734–1747.
- Alonso AA. Síndrome Metabólico. *Fisterra* [on line] 2005 [15 de diciembre de 2006]; URL disponible en: www.fisterra.com/guias2/Smetabolico.asp 2
- Alvarado Soto V, Jimenez Navarrete MF. Síndrome metabólico en pacientes diabéticos tipo 2 e intolerantes a carbohidratos del EBAIS. *Acta méd. Costarric* 2003;.45(4):154-157.
- Meisinger C, Koletzko B, Heinrich J. Metabolic syndrome: Older than usually assumed, but still too young to die. *Clin Chem*. 2006; 52: 897-8.