



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA GENERAL
TESIS PROFESIONAL

“Evaluación de la respuesta inflamatoria y la neurodegeneración inducida por el péptido- β_{1-42} en un modelo animal de síndrome metabólico”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

CLAUDIA ESCOBEDO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ALFONSO DÍAZ FONSECA

ASESORES DE TESIS:

MC. GENARO CARMONA GUTIERREZ

D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA



Octubre 2016

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A los integrantes del H. Jurado de Tesis profesional

Dr. Albino Moreno Rodríguez

Dr. Rubén Vázquez Roque

Dra. Berenice Venegas Meneses

Gracias por sus comentarios y el tiempo prestado a la presente tesis, además de aportar sus valiosos conocimientos.

A mis asesores de Tesis profesional

MC. Genaro Carmona Gutiérrez

Dr. Samuel Treviño Mora

Gracias por las atenciones prestadas para la realización de la presente tesis, por sus comentarios, por el tiempo y por enriquecer mi formación académica.

A la Dra. Anabella Handal Silva y al Dr. José Luis Moran Perales del Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del Instituto de Fisiología BUAP

Por brindarme el apoyo para la realización de los experimentos dentro de las instalaciones de su laboratorio.

Al Dr. Alfonso Díaz Fonseca

Me sobran las palabras para agradecer infinitamente el apoyo y la oportunidad que me brinda desde el primer día que lo fui a ver para trabajar con usted.

Agradezco a mis PADRES (Adelfo y Juana) por el apoyo incondicional, a mis hermanos (Omar y Lupita), a mis amigos, a mi facultad y a mi universidad BUAP.



VIEP

Vicerrectoría de Investigación
y Estudios de Posgrado

La presente tesis fue apoyada parcialmente por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado BUAP a través del proyecto

DIFA-NAT 15 I

DIFA-NAT 16 G



La presente tesis fue apoyada parcialmente por el Prodep a través del proyecto DSA/103.5/15/7449



CNBES

COORDINACIÓN NACIONAL DE BECAS DE EDUCACIÓN SUPERIOR

La autora de la presente tesis fue apoyada parcialmente por la beca-tesis con el No. 2242480 BECA O APOYO PARA LA TITULACIÓN PARA LA EDUCACIÓN SUPERIOR -2015.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	Síndrome metabólico.....	3
1.1.1	Criterios para diagnóstico de síndrome metabólico	3
1.1.2	Antecedentes en México.....	4
1.2	Hipertensión arterial.....	5
1.3	Dislipidemia	7
1.4	Diabetes mellitus.....	8
1.5	Resistencia a la insulina.....	9
1.5.1	Insulina	9
1.6	Obesidad.....	11
1.6.1	Radicales libres y estrés oxidativo.....	12
1.7	Metabolismo energético en el cerebro.....	13
1.8	Modelos de estudio de DM y relación con el deterioro cognitivo ...	14
1.9	Aprendizaje y memoria	18
1.10	Enfermedad de Alzheimer.....	19
1.10.1	El $A\beta_{1-42}$ síntesis, degradación y toxicidad.....	20
2.	JUSTIFICACIÓN	22
3.	HIPÓTESIS	23
4.	OBJETIVO GENERAL	23
4.1	Objetivos particulares	23
5.	METODOLOGÍA	24
5.1	Línea de trabajo	24
5.2	Sujetos experimentales.....	24
5.3	caracterización del SM.....	25
5.4	Preparación del $A\beta_{1-42}$	26
5.5	Cirugía estereotáxica.....	26
5.6	Evaluación de la prueba de NORt	26
5.7	Sacrificio y obtención de las muestras.....	27
5.8	Técnicas histológicas e histoquímicas.....	28
5.8.1	Tinción de hematoxilina-eosina.....	28
5.8.2	Tinción de PAS.....	28
5.8.3	Tinción tricrómica de Masson.....	29
5.8.4	Inmunohistoquímica para GFAP.....	29
5.9	Análisis estadístico.....	30
6.	RESULTADOS.....	31
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
8.	ESQUEMA HIPOTÉTICO	43
9.	CONCLUSIONES	44

10. PERSPECTIVAS 45
11. REFERENCIAS 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Componentes del SM	3
Figura 2	Criterios para el diagnóstico de SM	4
Figura 3	Encuesta nacional de salud y nutrición 2012.....	5
Figura 4	Relación entre la HA y el SM.....	6
Figura 5	Asociación de la dislipidemia con la RI.....	8
Figura 6	DMTII y disfunción endotelial.....	9
Figura 7	Molécula de insulina.....	10
Figura 8	Vía de la insulina/PI3K.....	10
Figura 9	Factores relacionados con la obesidad.....	11
Figura 10	Metabolismo periférico de glucosa.....	13
Figura 11	Astrocitos y sus funciones.....	14
Figura 12	Evaluación de tareas cognitivas por el MMSE.....	15
Figura 13	La administración de STZ disminuye el aprendizaje y la memoria en un modelo animal.....	16
Figura 14	Disminución del aprendizaje, memoria espacial y número de espinas dendríticas en ratas con A β ₂₅₋₃₅ y STZ.....	17
Figura 15	Disminución del aprendizaje y la memoria en un modelo animal con SM	17
Figura 16	Componentes del lóbulo temporal medial y formación hipocampal.....	18
Figura 17	Marcadores neurodegenerativos en la EA.....	19
Figura 18	Procesamiento del péptico A β	20
Figura 19	La inyección del A β ₁₋₄₂ en el hipocampo de rata en un modelo de SM disminuye el aprendizaje.	31
Figura 20	La inyección del A β ₁₋₄₂ en el hipocampo de rata en un modelo de SM disminuye la memoria a corto plazo.....	32
Figura 21	La inyección del A β ₁₋₄₂ en el hipocampo de rata en un modelo de SM disminuye la memoria a largo plazo.....	33
Figura 22	Fotomicrografías correspondientes a la tinción Hematoxilina-Eosina	34
Figura 23	Gráficas correspondientes a la cuantificación de células viables en regiones CA1, CA3 y GD.....	35
Figura 24	Fotomicrografías correspondientes a la tinción de PAS.....	36
Figura 25	Fotomicrografías correspondientes a la tinción Tricrómica de Masson.....	37
Figura 26	Panel representativo de la inmunohistoquímica para GFAP...	38
Figura 27	Esquema hipotético.....	43

ABREVIATURAS

- A β** : amiloide-beta
ADN: ácido desoxirribunucleico
AGEs: productos finales de glicación
AICD: dominio intracelular carboxílico del amiloide
Akt: proteína cinasa B
APP: proteína precursora del amiloide-beta
BHE: barrera hematoencefalica
DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol
DHC: dieta hipercalórica
DM: diabetes mellitus
DMTI: diabetes mellitus tipo I
DMTII: diabetes mellitus tipo II
DNC: dieta normocalórica
EA: enfermedad de Alzheimer
EDI: enzima degradadora de insulina
eNOS: sintasa de óxido nítrico de tipo endotelial
EO: estrés oxidativo
ERO: especies reactivas de oxígeno
FICT: fluorosceína 5-isotiocianato
GFAP: proteína acida gliar fibrilar
GLUTS: transportadores de glucosa
GLUT1: transportador de glucosa tipo 1
GLUT3: transportador de glucosa tipo 3
GSK3 β : glicógeno sintasa cinasa 3 beta
HA: hipertensión arterial
H&E: hematoxilina-eosina
HDL: lipoproteínas de alta densidad
H₂O₂: peroxico de hidrogeno
IL-6: interleucina-6
iNOS: sintasa de óxido nítrico de tipo inducible
ISR: receptor de insulina
KDa: kilodalton
LAM: laberinto acuático de Morris
LDL: lipoproteínas de baja densidad

MNT: marañas neurofibrilares

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

NMDA: N-metil de aspartato

NO: óxido nítrico

NORt: test de evaluación de objetos novedosos

NOS: sintasa de óxido nítrico

O₂⁻: anión superóxido

OH: radical hidroxilo

OMS: organización mundial de la salud

PAS: ácido periódico de Schiff

PCR: proteína C reactiva

PIP₂ fosfatidil inositol 3,4 difosfato

PI3K: fosfatidil inositol 3 cinasa

PN: placas neuríticas

RI: resistencia a la insulina

SM: síndrome metabólico

SNC: sistema nervioso central

SSI: Solución salina isotónica

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un cuadro clínico caracterizado por la presencia de resistencia a la insulina (RI) asociado a trastornos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, cifras elevadas de presión arterial y obesidad, que en conjunto son factores de riesgo para enfermedades como diabetes mellitus tipo II (DMTII) y enfermedad cardiovascular (OMS, 1998) (Figura 1).

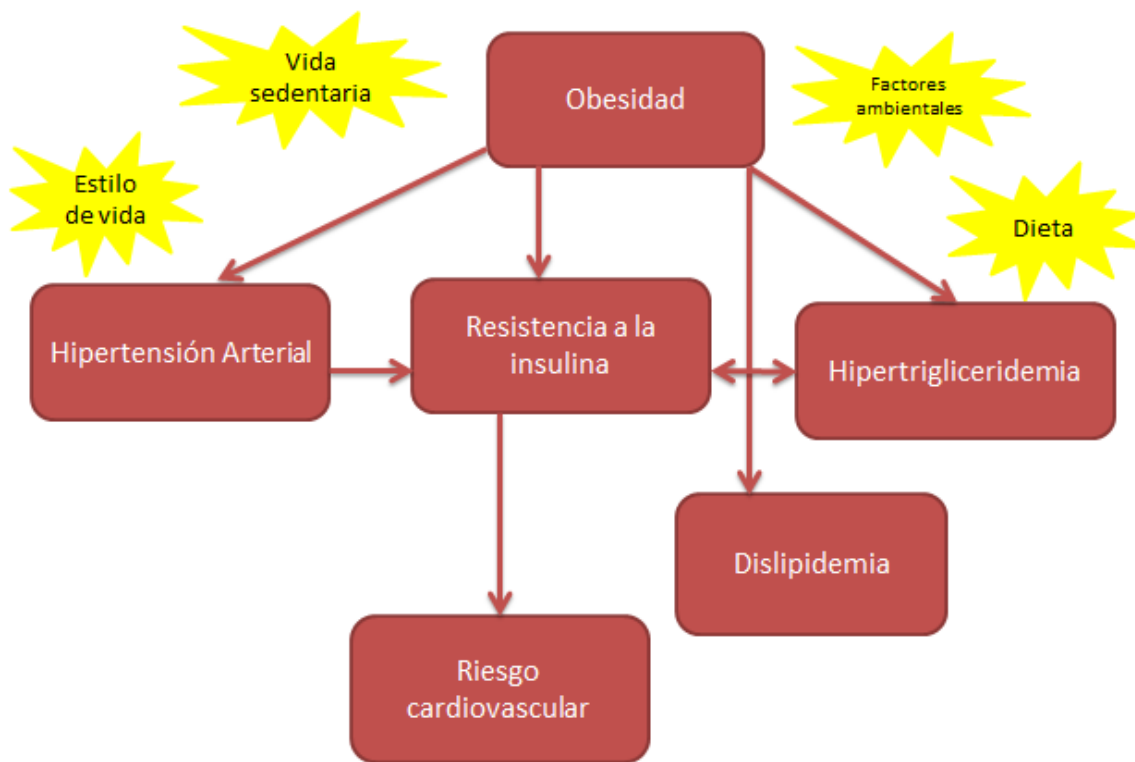


Figura 1. Componentes del síndrome metabólico. Enfermedades relacionadas a la presencia de SM, además de otros factores que predisponen a la aparición de alguna enfermedad relacionada con el SM y la relación entre estas enfermedades (Tomada y modificada de Barazzoni y cols 2013).

1.1.1 Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico

Se habla de SM a la presencia de dos o más factores mencionados en la figura 2 y se comparan algunos parámetros establecidos por algunas organizaciones mundiales. El SM es un grave problema de salud pública en nuestro país, aunque también se ha visto un

incremento en la incidencia de casos y pacientes que cursan con esta entidad clínica de manera mundial (González 2012, CMRlySM 1999).

	ATP III	OMS	AACE	IDF
Triglicéridos $\geq 150\text{mg/Dl}$	X	X	X	X
HDL $< 40\text{mg/dL}$ en varones y 50mg/dL en mujeres	X	X	X	X
Presión arterial $>150/85\text{mmHg}$	X	X	X	X
Resistencia a la Insulina		X		
Glucosa en ayunas mayor a 100mg/dL	X		X	X
Glucosa 2h: 140mg/dL			X	
Obesidad abdominal	X			X
Índice de masa corporal (IMC) elevado		X	X	
Microalbuminuria		X		
Factores de riesgo y diagnóstico	3 más RI	Más de 2	Criterio Clínico	Obesidad Abdominal

Figura 2. Criterios para el diagnóstico de SM. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE), Federación Internacional de Diabetes (IDF) y la Guía para el Tratamiento en Adultos III (ATP III), se considera como SM a la presencia de dos o más criterios mencionados en la tabla (Tomada de Lizarzaburu, 2013).

1.1.2 Antecedentes en México

En el 2012 la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT, 2012), arroja datos importantes sobre el incremento de enfermedades como la DMTII, hipertensión arterial (HA) y obesidad en nuestro país, dichos padecimientos conllevan a enfermedades cardiovasculares y se encuentran entre las principales causas de muerte aumentando el número de defunciones en la población nacional. Se pronostica que el número de padecimientos aumentará en los próximos 50 años si no se toman las medidas de salud correspondientes en los distintos rubros de la población (Figura 3).

“Evaluación de la respuesta inflamatoria y la neurodegeneración inducida por el péptido amiloide β 1-42 en un modelo animal de síndrome metabólico”

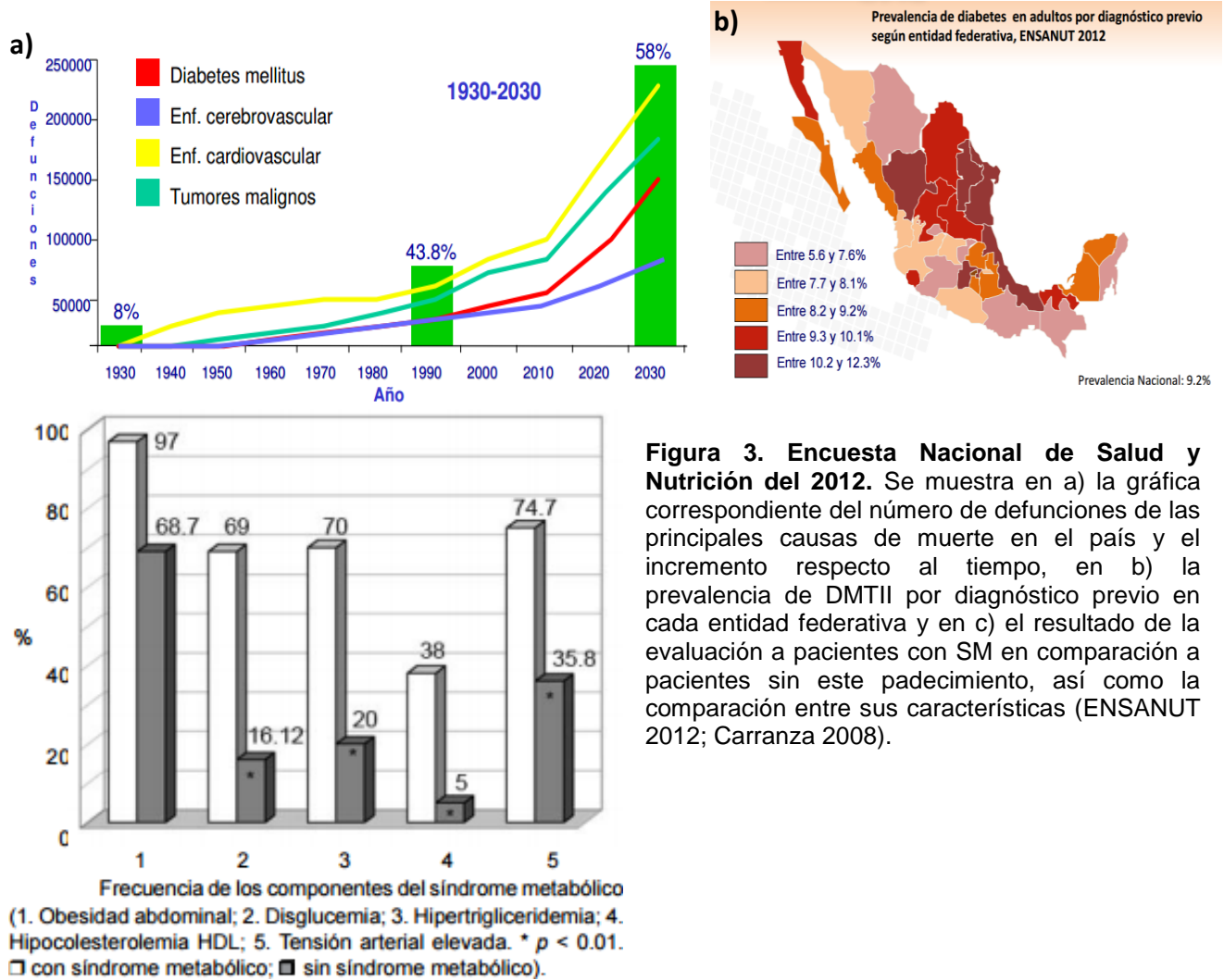


Figura 3. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2012. Se muestra en a) la gráfica correspondiente del número de defunciones de las principales causas de muerte en el país y el incremento respecto al tiempo, en b) la prevalencia de DMTII por diagnóstico previo en cada entidad federativa y en c) el resultado de la evaluación a pacientes con SM en comparación a pacientes sin este padecimiento, así como la comparación entre sus características (ENSANUT 2012; Carranza 2008).

1.2 Hipertensión arterial

La HA se define como un trastorno ocasionado por una tensión alta y persistente de los vasos sanguíneos, esta tensión es la fuerza ejercida por la sangre contra las paredes de las arterias al ser bombeada por el corazón (OMS, 2013). La presión arterial normal en un adultos es de 120/80mmHg (tensión sistólica/tensión diastólica), cuando esta presión tiene cifras iguales o superiores a 140/90mmHg durante periodos prolongados, se habla de HA. Este padecimiento se encuentra dentro las principales complicaciones cardiovasculares que se presentan en la población mundial (González, 2012).

Los trastornos metabólicos asociados a HA juegan un papel crucial en la aparición y diagnóstico de la HA como la DMTII, donde alteraciones en el metabolismo de glucosa o la RI las relacionan íntimamente, además se asocia también a obesidad. Los mecanismos por los cuales se desarrolla esta interacción aún se desconocen, pero se sugiere que la RI, la inflamación y la disfunción endotelial son mecanismos que condicionan a dicha interacción (Olivares 2008; Rask 2012). Diversos estudios revelan que en pacientes con HA existe un incremento en las alteraciones del metabolismo de glucosa, se da la presencia de Dislipidemia e hiperinsulinemia, esto ha sugerido que en pacientes con HA se da una prevalencia alta para el desarrollo de SM (Rask, 2012) (Figura 4).

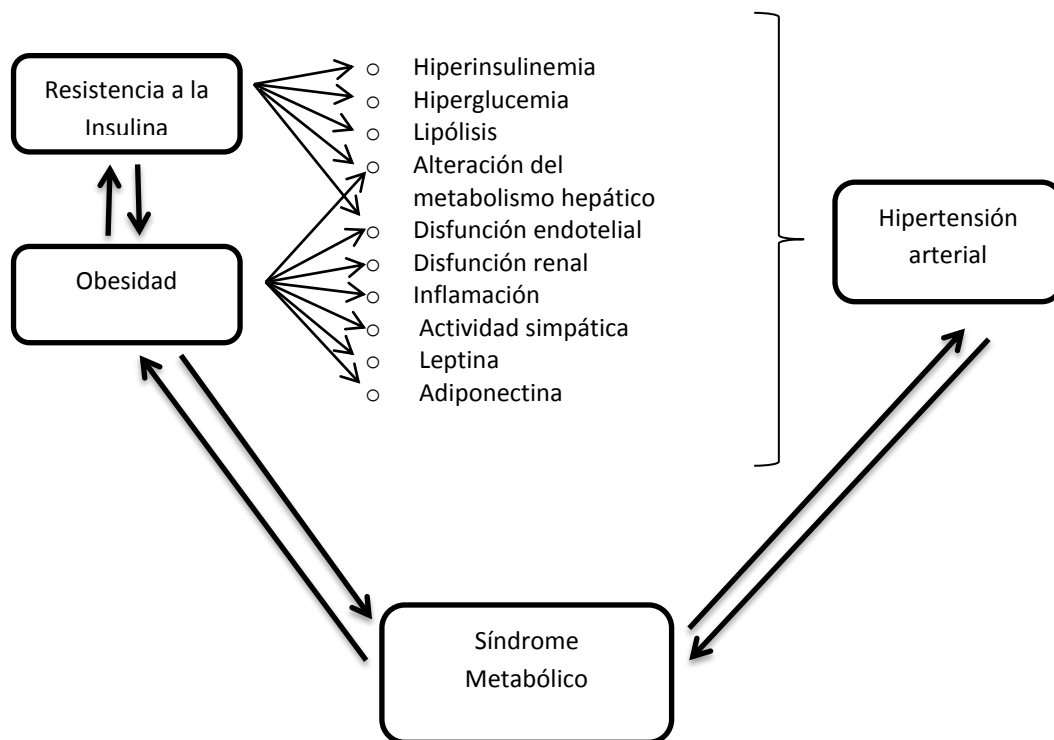


Figura 4. Relación entre la HA y el SM. Se muestra la relación entre la HA con el SM, las alteraciones que pueden estar presentes en ambas entidades clínicas (Tomado de Cordero y cols, 2005).

Se ha propuesto que el tejido adiposo tiene una participación en la prevalencia del SM por la síntesis de diversas hormonas e interleucinas como la resistina la cual se relaciona directamente con la distensión endotelial y con la aparición de HA. Los valores bajos de la

resistina trae consigo el aumento de triglicéridos, el aumento de proteínas de baja densidad (LDL), la disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la elevación de la presión arterial (Olivares, 2008; Van Dijk 2015).

Asimismo la función renal condiciona la presencia de HA por la disminución en la capacidad de excretar sodio por el riñón lo que aumenta la presión de filtración y por lo tanto la presión arterial; esta disfunción renal ha sugerido la presencia de microalbuminuria implicada en el SM que conlleva a un riesgo cardiovascular (Chávez Tapia, 2004).

En 2012 la National Health and Nutrition Examination Survey (NHAHES) III mostró una elevada prevalencia del SM en la población americana, donde el 24% de los pacientes presentó al menos 3 criterios diagnósticos de SM y el 34% de estos pacientes presentó HA; en otros estudios como el Women Health Study (WHS) el 75% de los sujetos diagnosticados con SM fueron hipertensos y en el Metabolic Syndrome in Active Subjects (MESYAS) se demostró que el SM es más prevalente en pacientes con HA que en pacientes obesos, pero la presencia de ambos eventos potencia la aparición de SM (Alegría y cols, 2005).

La obesidad, la presencia de glucemia basal elevada y la disminución de HDL son situaciones asociadas con la presencia de SM y la disfunción renal y a su vez estos factores se encuentran correlacionados con la HA y vinculados con el estilo de vida y los hábitos alimenticios (Alegría y cols, 2005; Cordero, 2005).

1.3 Dislipidemia

La Dislipidemia se define como una elevación en los niveles de triglicéridos (hipertrigliceridemia), incremento de colesterol (hipercolestorilemia), disminución de HDL, acumulación de partículas remanentes y aumento LDL (Goldberg 2015).

La hipertrigliceridemia es una entidad asociada a la RI (Figura 5) y esta a su vez se correlaciona con la DMTII, ya que en pacientes diabéticos se presenta un incremento en triglicéridos, en las proteínas LDL y en los ácidos libres que promueven la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y la disminución de las proteínas HDL, lo que contribuye a una alteración vascular que puede manifestarse en la presencia de aterosclerosis (Goldberg, 2015; Carrillo, 2006; Duarte, 2011).

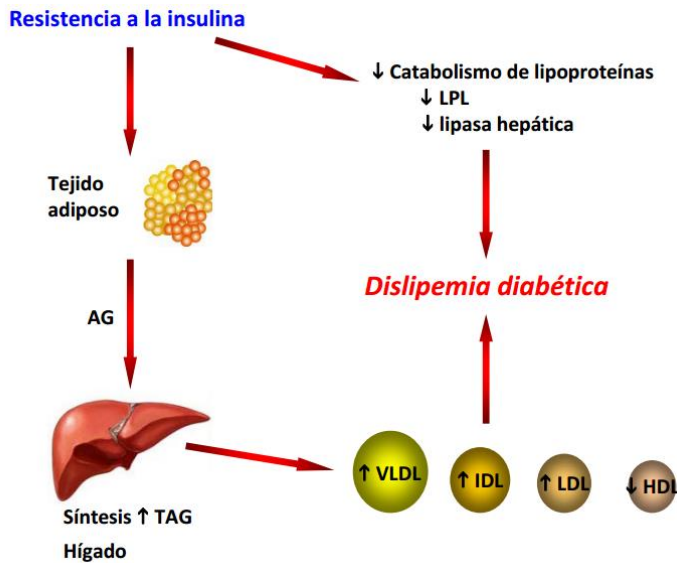


Figura 5. Asociación de la Dislipidemia con la RI. Se muestra que la RI condiciona la síntesis de ácidos grasos en el hígado y por ende el aumento de las lipoproteínas lo que ocasiona un estado de Dislipidemia (Tomado de González, 2012).

1.4 Diabetes mellitus

La DM es una enfermedad caracterizada por niveles elevados de glucosa a nivel periférico (hiperglicemia), como consecuencia de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o ambas (OMS, 1999; Patel H, 2015). La diabetes se divide en: tipo I, tipo II y gestacional y se caracterizan por la deficiencia de la insulina, la utilización ineficaz de la misma y por una hiperglicemia marcada durante el embarazo (OMS, 1999). Este padecimiento se asocia a complicaciones cardiovasculares que pueden llevar al fallo de diversos órganos, además de complicaciones como lo son la retinopatía, nefropatía y neuropatía (Mediavilla, 2001).

En la DMTII la hiperglicemia resulta de gran importancia debido a las complicaciones que puede causar, esto debido al déficit de la acción de la insulina, una hiperglucemia crónica, reduce la sensibilidad y la secreción de la insulina (glucotoxicidad) y puede llevar a la RI (CMRISM, 199; Mediavilla, 2001; Kaku, 2010). La RI condiciona a un estado de hiperglicemia crónica y los efectos negativos de esta se denominan glucotoxicidad. La glucotoxicidad también se refiere a una ingesta en exceso de carbohidratos por parte de células y tejidos, este exceso de carbohidratos pueden convertirse en ácidos grasos libres y triglicéridos que posteriormente pueden ser hepatotóxicos, llevándonos a otro fenómeno llamado lipotoxicidad

que se refiere a los efectos nocivos por altas concentraciones de lípidos y la ingesta de dietas ricas en carbohidratos y lípidos (Mota, 2015).

Además de estos fenómenos la hiperglicemia lleva a complicaciones vasculares como el daño al endotelio por el flujo constante de glucosa al interior de la célula, la producción de productos finales de glicación (AGEs) avanzada y el incremento de ERO y EO.

La producción de AGEs se debe a las reacciones químicas entre subproductos de azúcares y proteínas, lípidos o ácidos nucleicos produciendo modificaciones por la reducción de azúcares llamada glicosilación. La glicosilación tiene como consecuencia la modificación de las proteínas en su estructura, propiedades físico-químicas y funciones biológicas (González Flecha, 2000; Cade, 2008) (Figura 6).

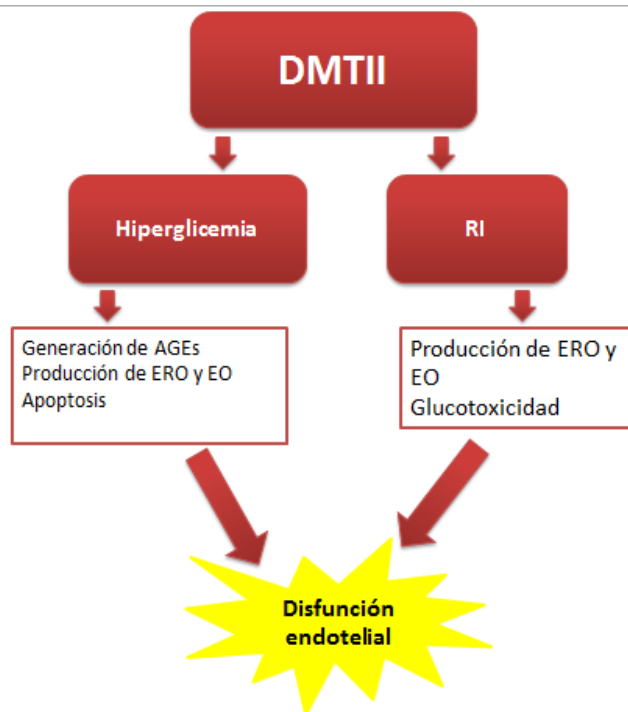


Figura 6. DMTII y disfunción endotelial. La DMTII presenta dos características importantes la presencia de una hiperglicemia crónica y la RI. La hiperglicemia por un lado genera AGEs resultado de un fenómeno llamado glicación, en este estado de hiperglicemia se da la inhibición de la sintasa de óxido nítrico de tipo endotelial (eNOS) que aumenta la aparición de ERO y de EO condicionando la muerte celular y apoptosis. La RI condiciona a un estado de glucotoxicidad que lleva a la sobreproducción de ERO y EO, llevándonos así a una disfunción endotelial (Tomada de Cade, 2008).

1.5 Resistencia a la insulina

1.5.1 insulina

La insulina es una hormona peptídica secretada por células β en los islotes pancreáticos de Langerhans (Figura 7), formada por dos cadenas $\alpha - \beta$, unidas por puentes disulfuro. La secreción de esta hormona se da por diversos estímulos (Kido, 2001; Wilcox, 2005).

“Evaluación de la respuesta inflamatoria y la neurodegeneración inducida por el péptido amiloide β 1-42 en un modelo animal de síndrome metabólico”



Figura 7. Molécula de insulina. Esta hormona tiene un peso de 5.8KDa, unida por dos puentes disulfuro, su precursor la proinsulina que al pasar por proteasas forman a la insulina para así ser secretada por las células β del páncreas.

Esta hormona tiene como funciones el control de la glucosa en la sangre, la regulación del metabolismo de carbohidratos, proteínas y la síntesis de ADN (Olivares, 2008; Mathews, 2002). Lleva a cabo su acción al unirse a su receptor, que da como resultado una serie de señalizaciones activando vías de segundos y terceros mensajeros, cómo la vía de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), que promueve diversas funciones como crecimiento, metabolismo y supervivencia celular (Daragmeh, 2015) (Figura 8).

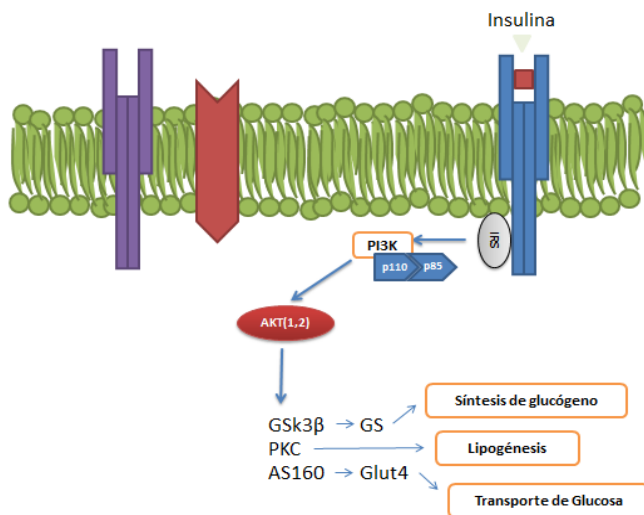


Figura 8. Vía de la insulina/PI3K. Al unirse la insulina a su receptor se fosforila el sustrato de insulina (ISR), el cual a su vez fosforila la subunidad p85 de la PI3K, lo anterior resulta en un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad p110; la PI3K activa fosforila el fosfatidil inositol 3,4 ifosfato (PIP2) y lo convierte en fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) que conduce a la activación de la proteína Akt, la cual activa a otras proteínas como GSK3 β , PKC o AS160 cuyas funciones son específicas (Tomada y modificada de Guo, 2004).

La RI se define como la disminución de la eficacia biológica de la hormona, donde ésta es producida en cantidades normales o elevadas pero no es utilizada eficazmente, también se relaciona con la una deficiencia en la señalización a nivel de post-receptores, así como anomalías en la función de los transportadores de glucosa (NIH, 2006; Wilcox, 2005; González, 1999). La RI así como la deficiencia de la insulina varía de acuerdo a la función fisiológica que desempeñará.

La función principal de la insulina a nivel periférico es ayudar a la glucosa para que sea absorbida por los tejidos diana, cuando existe una desregulación en esta función y/o los niveles de glucosa a nivel periférico aumentan la secreción de la hormona también aumenta como un mecanismo de compensación el cual resulta en una sobreproducción de la hormona (hiperinsulinemia) (Wilcox, 2005). Existen también otros mecanismos que influyen en la RI como la dieta hipercalórica, ejercicio, estrés, obesidad, consumo de algunos fármacos y alcohol (Kaku, 2010; Varman, 2012).

1.6 Obesidad

Otro componente del SM es la obesidad que se considera un problema de salud mundial, no sólo tiene alteraciones físicas sino que otros factores se ven involucrados como factores económicos y sociales (González, 2012; Scarpellini, 2010) (Figura 9).



Figura 9. Factores relacionados con la obesidad. La obesidad se relaciona con factores como RI, DMTII, es un proceso inflamatorio y lleva a riesgo cardiovascular, por otro lado es un grave problema de salud donde México destaca por ocupar los primeros lugares a nivel mundial e incrementando estas cifras en los últimos 30 años (Tomada y modificada de Bays, 2013, ENSANUT, 2012).

La obesidad se define como el incremento en el contenido del tejido adiposo corporal, desequilibrio entre la ingesta alimenticia excesiva y el gasto calórico disminuido. Se caracteriza por la hipertrofia de células adiposas que al llegar a ser grave se acompaña de hiperplasia celular. Por otro parte se ha visto una disminución de receptores de insulina en

este tejido además de que secreta diversas sustancias como leptina, adiponectina, resistina y TNF- α . (Bays y cols, 2013; Flores ,2011).

El tejido adiposo es sensible a los efectos de la insulina lo cual promueve la captación de los triglicéridos. En pacientes obesos la producción de ácidos grasos aumenta lo que origina la disminución en la utilización de la glucosa a nivel periférico y condiciona a la RI e hiperinsulinemia (Bays y cols, 2013; CMRISM, 1999, González, 2012)

Los adipocitos liberan con abundancia ácidos grasos ya que el tejido adiposo es el mayor almacén de triglicéridos, en pacientes obesos generalmente existe un estado de RI que condiciona a una liberación de ácidos grasos libres aumentada ya que existe una desregulación en el control de la lipólisis.(Bays y cols, 2013).

A su vez la obesidad está relacionada directamente con un estado inflamatorio crónico que favorece el desarrollo de alteraciones metabólicas estrechamente relacionadas con la producción de radicales libres y procesos oxidativos (Ríos y cols, 2014). La obesidad se caracteriza por la sobreproducción de citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) y proteína C reactiva (PCR). Esta sobreproducción resulta en una inflamación del tejido adiposo asociado a una inflamación sistémica (Patel, 2015). Estas citocinas condicionan a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y promueven un proceso denominado estrés oxidativo (EO).

El EO se puede definir como un desbalance entre especies oxidantes y especies antioxidantes (Halliwell, 2006), en este proceso también se correlacionan otras alteraciones como la elevación de triglicéridos, la oxidación de proteínas LDL, obesidad y RI que promueven la aparición de EO (Bays, 2013; Fernández, 2011, González, 2012).

1.6.1 Radicales libres y estrés oxidativo

El TNF- α inhibe la actividad de la PCR generando el anión superóxido (O_2^-), el tejido adiposo por su lado secreta a la angiotensina II que estimula la actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), además de esto se incrementa el gasto cardiaco y una consecuencia es el mayor consumo de oxígeno que aumenta la producción de ERO como

radical hidroxilo (OH), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a través de la pérdida de electrones en la cadena transportadora de e^- .

Otro mecanismo puede ser a través del consumo de alimentos con alto contenido en carbohidratos y grasas ya que pueden alterar el metabolismo del oxígeno, el tejido graso puede sufrir reacciones de oxidación y llevar a la producción de ERO, si esta producción excede la capacidad antioxidante de la célula el EO puede llevar a una peroxidación lipídica que puede llevar al desarrollo de aterosclerosis (Fernández 2011, Halliwell, 2006, Ríos 2014) (Figura 10).

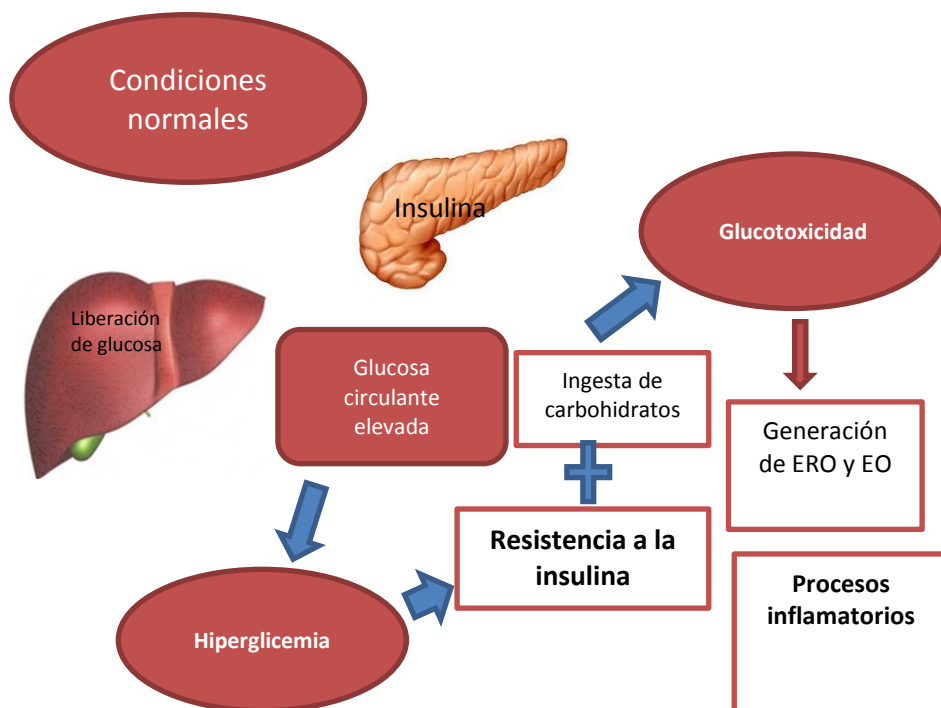


Figura 10. Metabolismo periférico de glucosa. En condiciones normales la liberación de glucosa por parte del hígado es mediada por la insulina secretada por el páncreas para mantener las condiciones de homeostasis en el organismo, cuando la glucosa se eleva y el páncreas no es capaz de secretar la insulina para mediar esta situación se da la RI e hiperinsulinemia, que aunado a una dieta rica en carbohidratos nos lleva a un proceso denominado glucotoxicidad, en este proceso se da la generación de ERO y EO, además de la presencia de procesos inflamatorios (Mota, 2015).

1.7 Metabolismo energético en el cerebro

El cerebro debe generar grandes cantidades de adenosín trifosfato (ATP) que es fundamental para la obtención de energía celular, además de que en el cerebro mantiene el potencial de

membrana y la transmisión de impulsos nerviosos, el cerebro usa a la glucosa como principal fuente de energía oxidándola a través de glucólisis aeróbica, el 25% de glucosa consumida llega a cerebro pues atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), también el cerebro produce su propia glucosa esto a través de células gliales específicamente los astrocitos, que además también captan glucosa y la transportan. El astrocito es un tipo de célula glial que se encarga de dar sostén al cerebro, además favorece la comunicación celular, fagocita las células muertas y forma parte de la BHE para ayudar a regular las actividades sinápticas (Kandel,2001) (Figura 11).

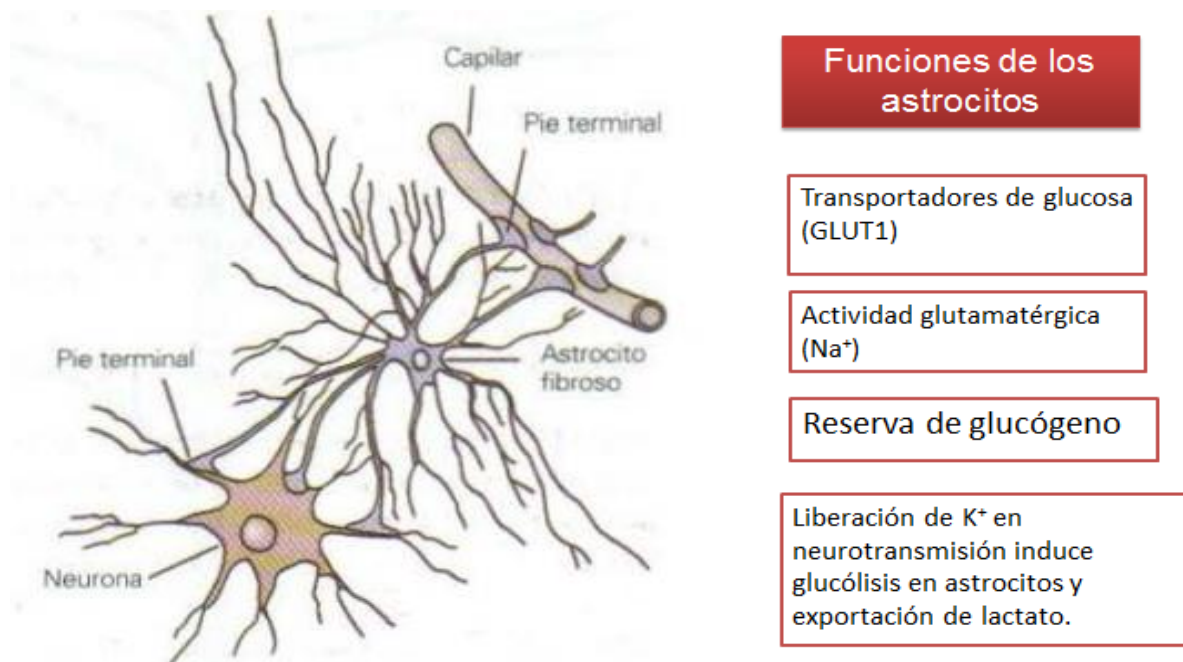


Figura 11. Los astrocitos y sus funciones. En a) se muestran los astrocitos y la morfología peculiar de estrella, en b) se muestra un pequeño cuadro con las funciones generales que llevan en relación al metabolismo de glucosa en el cerebro (Escartin, 2013).

1.8 Modelos de estudio de DM y relación con el deterioro cognitivo

Los efectos que la DM tiene a nivel periférico son bien conocidos, pero en años recientes ha llamado la atención el efecto que esta enfermedad tiene sobre el cerebro en particular en las funciones cognitivas. Hasta el momento los mecanismos involucrados en la relación que existe entre la DM y las funciones cognitivas son desconocidos, se ha propuesto que se

encuentran involucrados los procesos de hiperglicemia, hipoglucemia, RI y enfermedades vasculares (Mediavilla, 2001; Kodl, 2008).

Se considera al deterioro cognitivo como una posible consecuencia de la diabetes, ejemplo de ello es la investigación de la diabetes como factor de riesgo en demencias. Ventura en 2004 realizó un estudio a 18 sujetos con DMTI y DMTII para evidenciar sí la presencia de DM afecta en la resolución de algunas tareas cognitivas (Figura 12).

	Diabéticos	No diabéticos
Orientación temporal	4.38	4.78
Orientación espacial	4.75	4.89
Fijación	3	3
Concentración y cálculo	2.6	4.4
Memoria	1.5	2.3
Denominaciones	2	2
Repetición	1	1
Orden en 3 etapas	2.63	3
Lectura	0.5	1
Escritura	0.33	0.67
Copia	0.56	0.78
Total	23.25	27.82

Figura 12. Evaluación de tareas cognitivas por el MMSE. El mini examen del estado mental (MMSE) evalúa tareas cognitivas como la orientación, memoria, la atención, lenguaje y capacidad visual cuya puntuación total es de 30 puntos, para determinar la presencia de algún tipo de demencia. Se puede apreciar que en los pacientes diabéticos este puntaje entra dentro de una demencia de tipo leve respecto al grupo de pacientes no diabéticos cuyo puntaje no es significativo para considerarse dentro de algún tipo de demencia (Ventura, 2004).

La hiperglicemia juega un papel importante en la homeostasis de otros órganos; en el cerebro se ha propuesto que el incremento crónico de la glucosa produce alteraciones en los mecanismos inflamatorios y como resultado puede alterar las funciones cognitivas en pacientes con diabetes. En un estudio de inducción de DM en un modelo animal con estreptozotocina (STZ) se ha observado que los animales con hiperglicemia crónica muestran cambios en el aprendizaje y se ha sugerido que puede ser resultado de una deficiencia en la insulina (Biessels, 1996) (Figura 13).

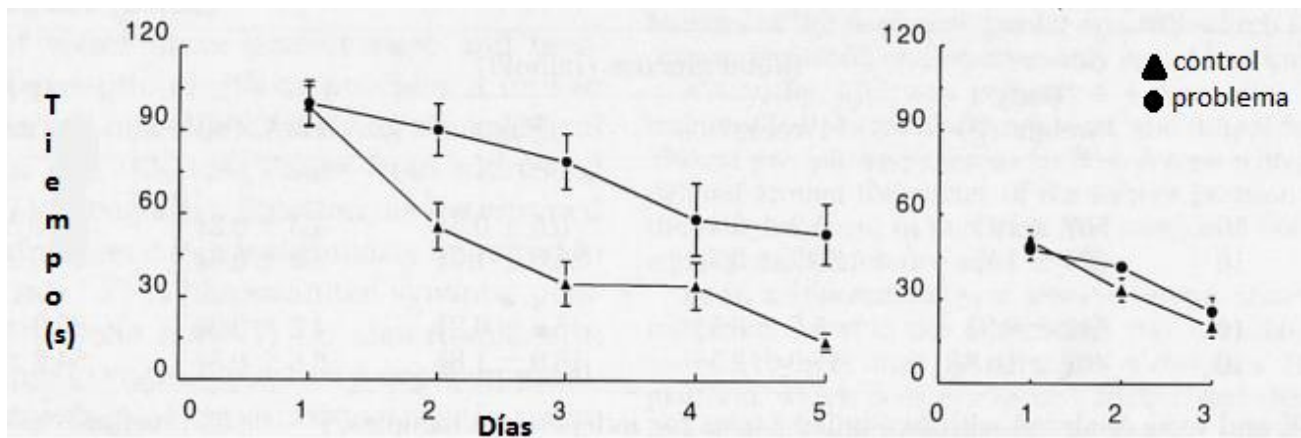


Figura 13. La administración de STZ disminuye el aprendizaje y la memoria en un modelo animal. Se muestra la evaluación del aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris (LAM) dónde podemos observar el aumento en el tiempo de latencia a la plataforma de escape del laberinto acuático de Morris por parte del grupo problema respecto al control (Tomada de Biessels, 1996).

La insulina juega un rol importante en el mantenimiento de los niveles periféricos de glucosa en el organismo incluyendo el cerebro. La insulina tiene diversas acciones en el cerebro, actúa como un neuromodulador, promueve acciones neurotróficas, de crecimiento y diferenciación neuronal, modula la expresión de receptores N-metil de aspartato (NMDA) e incrementa el flujo de Ca^{2+} reforzando la comunicación sináptica entre neuronas (Duarte 2011). Anteriormente se consideraba que la insulina no cruzaba la BHE para llegar al cerebro, pero diversos estudios han demostrado lo contrario, ya que la insulina procedente de las células β pancreáticas es transportada por el fluido cerebroespinal y regulada en el mismo a través de su receptor (Olivares, 2008; Duarte, 2011). En el cerebro, los receptores de insulina se han encontrado distribuidos en zonas como el bulbo olfatorio, hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y amígdala (Gerozissis, 2003).

Otro estudio de inducción de DM en un modelo animal con STZ más la inyección del péptido $A\beta_{25-35}$, péptido utilizado en modelos animales para inducir la pérdida de memoria y estudiar los efectos de enfermedades como el Alzheimer (EA), muestra una disminución en el aprendizaje y la memoria, además muestra también la disminución en la arborización dendrítica y del número de espinas dendríticas de neuronas del hipocampo (Hp) (Lazcano, 2014) (Figura 14).

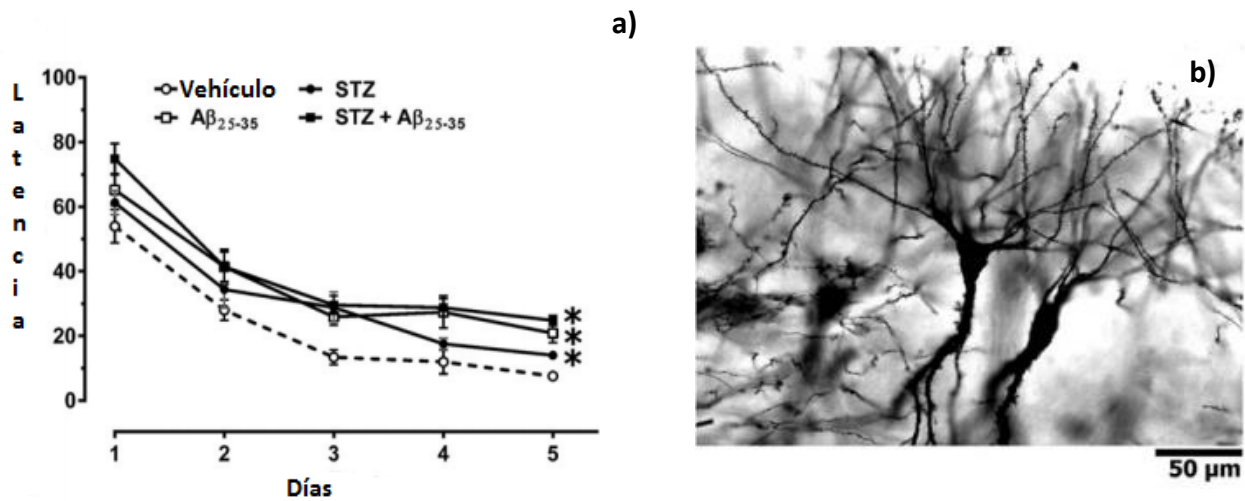


Figura 14. Disminución del aprendizaje, memoria espacial y número de espinas dendríticas en ratas con A β ₂₅₋₃₅ y STZ. En a) se muestra la evaluación del aprendizaje y la memoria en el LAM donde se puede observar que los grupos A β ₂₅₋₃₅ y A β ₂₅₋₃₅+STZ aumentan el tiempo de latencia a la plataforma de escape respecto a los grupos controles (vehículo y STZ). En b) se muestra una microfotografía de la tinción Golgi-Cox de células piramidales de la región CA1 del Hp donde se ve una disminución en la arborización de estas células así como en el número de sus espinas (Tomada de Lazcano, 2014).

Se ha visto que los modelos de inducción de DM con STZ llevan a una hiperglicemia crónica y que muestran cambios en los procesos de aprendizaje y memoria, por otro lado se sabe que la DM forma parte del SM y que este cuadro clínico también puede estar involucrado en la disminución de procesos cognitivos así lo demuestra Treviño en 2015 con un modelo animal de SM donde se observa la disminución de estos procesos (Figura 15).

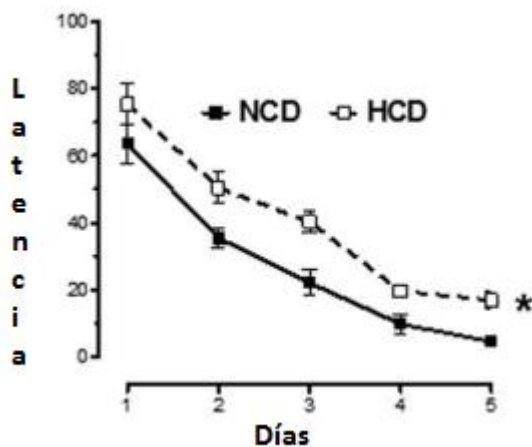


Figura 15. Disminución del aprendizaje y la memoria en un modelo animal de SM. Se muestra la evaluación de estos procesos en el LAM, donde se observa el aumento del tiempo de latencia a la plataforma de escape en las ratas con SM respecto a las ratas control (Tomada de Treviño, 2015).

1.9 Aprendizaje y memoria

El aprendizaje se define como el proceso por el cual se adquieren conocimientos los cuales son procesados, codificados, almacenados y posteriormente recuperados a lo que se le llama memoria. La memoria se divide en dos tipos: memoria a corto plazo (cantidad de información limitada retenida por un lapso de tiempo corto) y memoria a largo plazo (información ilimitada y almacenada por un tiempo largo y permanentemente) (Kandel, 2001)

El conocimiento se adquiere a través del procesamiento de las áreas de asociación (corteza prefrontal, límbica o parietooccipitotemporal) dónde se adquiere información visual, auditiva y somática, posteriormente esta información es transportada a la corteza parahipocámpal y perrinal, luego a la corteza entorrinal, la circunvolución dentada, el hipocampo, el subículo y de ahí de nuevo a la corteza entorrinal donde la información es devuelta a la corteza hipocámpal y perrinal para de nuevo regresar a las áreas de asociación de la neocorteza (Figura 16) (Kandel, 2001).

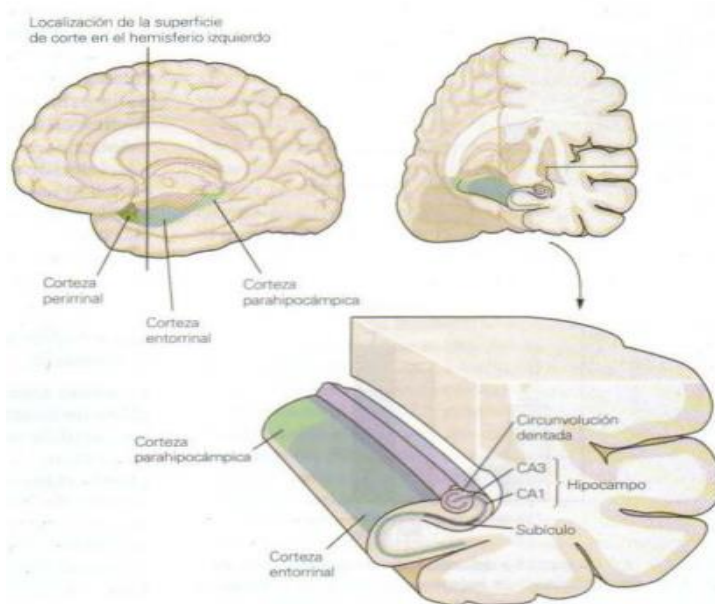


Figura 16. Componentes del lóbulo temporal medial y formación hipocámpal. Se observan los componentes del lóbulo temporal medial (corteza perrinal, corteza entorrinal, corteza parahipocámpal e hipocampo), además se observan los componentes del hipocampo (regiones CA1, CA3, circunvolución dentada, y subículo) (Tomada de Kandel, 2001).

Como se explicó anteriormente las áreas como la corteza entorrinal y el hipocampo son las áreas determinantes para el almacenamiento de la información adquirida, es por eso que alteraciones en estas áreas afectarían directamente en los procesos de aprendizaje y memoria como ocurre en la EA. Específicamente se ha visto que el hipocampo es un área que se asocia con la memoria espacial y de reconocimiento, por lo que lesiones en esta área disminuyen este tipo de memorias (Buffalo, 2006; Malcolm, 2001).

1.10 Enfermedad de Alzheimer

La EA es el tipo de demencia más común dentro de la población senil, aproximadamente afecta a pacientes entre los 60 y 85 años de edad, la etiología de esta enfermedad es de tipo idiopático aunque en algunos casos se ha relacionado a alteraciones genéticas, se calcula que para el 2050 la población afectada con este padecimiento incrementará a 106.2 millones de personas en todo el mundo (Brookmeyer y cols 2007), esta enfermedad afecta circuitos neuronales y estructuras cerebrales siendo sistemas colinérgicos y glutamatérgicos los más afectados (Maki y cols, 2002), dañando la innervación y función en áreas como el hipocampo, la corteza temporal y frontal (Selkoe, 2001).

Los marcadores que se observan en este padecimiento son las placas neuríticas (PN) formadas por agregados del péptido $A\beta$ y las marañas neurofibrilares (MNF) constituidas por la hiperfosforilación de la proteína tau (Selkoe, 2001) (Figura 17).

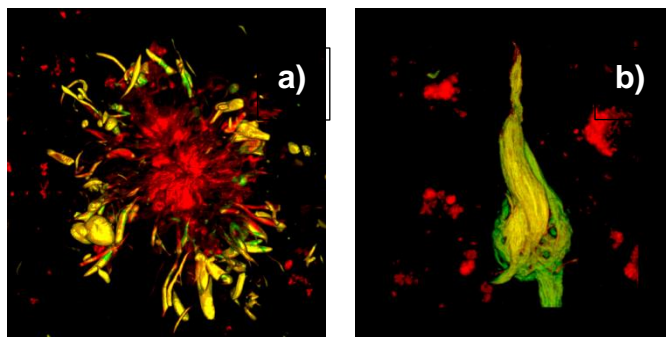


Figura 17. Marcadores neurodegenerativos en la EA. Se muestra un microfotografía de placas neuríticas en a), de forma esférica conformadas por la proteína $A\beta$ que es una proteína insoluble, mientras que en la microfotografía de b) se observan las marañas neurofibrilares, compuestas por filamentos insolubles constituidos por la proteína tau.

Existen varias hipótesis sobre el origen de la EA, dónde se propone una muy importante causada por el péptido $A\beta$ que sugiere que inicia con una serie de eventos que al final conduce a la neurodegeneración, algunos eventos que se pueden presentar son: excitotoxicidad, la presencia de ERO y EO, muerte neuronal y procesos inflamatorios que conducen a un deterioro cognitivo. Los procesos inflamatorios son de tipo crónico, ya que se observa el aumento exacerbado de citocinas proinflamatorias y la activación de la microglía (Matos, 2008; Van Dijk, 2015), aunado a estos procesos que pueden darse por la toxicidad del péptido $A\beta$ como de la proteína tau, estudios recientes muestran que padecimientos metabólicos como lo son la DM, la obesidad, y SM pueden incrementar su aparición (Pasinetti y cols, 2008; van Dijk y cols, 2015).

En la actualidad se cuentan con modelos experimentales *in-vitro* e *in-vivo* para estudiar la EA, como lo son líneas celulares y modelos transgénicos en ratones, también en modelos animales la inyección del péptido $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{25-35}$ en regiones específicas del cerebro ha servido para conocer la toxicidad del péptido $A\beta$ (Gonzalo-Ruiz, 1999; Díaz, 2009).

1.10.1 El $A\beta$ síntesis, degradación y toxicidad.

El péptido Amiloide- β ($A\beta$) está formado por una cadena de 39-43 aminoácidos con un peso de 4KDa, este péptido deriva de una proteína de mayor tamaño llamado proteína precursora de amiloide β (APP), proteína transmembranal 1TM (695-770 a.a), que a través de un proceso proteolítico formara el péptido $A\beta$ (Butterfield, 2012). El $A\beta$ se forma por la acción de β -secretasa generando un fragmento c99 y posteriormente la γ -secretasa actúa generando el dominio intracelular carboxílico del Amiloide (AICD) y el $A\beta$ (Blennow y cols., 2006) (Figura 18).

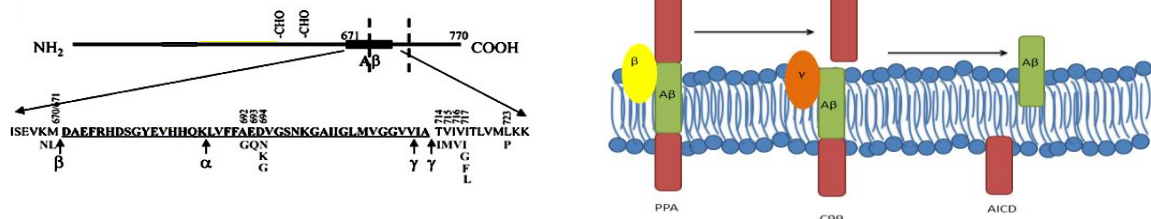


Figura 18. Procesamiento del péptido $A\beta$. La proteína precursora del amiloide (APP) anclada a la membrana por acción de β y γ cortan en sitios específicos quedando el fragmento C99, el dominio intracelular carboxílico del amiloide (AICD) y el péptido $A\beta$ (Tomada y modificada de Butterfield, 2012).

La presencia del A β en concentraciones elevadas y su estado de agregación son el factor clave para determinar su neurotoxicidad, la acumulación de esta proteína y la agregación de la misma propician la pérdida sináptica y muerte neuronal (Tatarnikova, 2015; Nalivaeva, 2014), además de la activación de la glía donde se da la liberación de citosinas, interleucinas y la expresión de la sintasa del óxido nítrico de tipo inducible (iNOS) que aumenta la producción de óxido nítrico (NO), cambios en la homeostasis del Ca⁺⁺, activación de las sintasas del óxido nítrico (NOS) aumentando la presencia de radicales libres y la formación de ERO, procesos neuroinflamatorios, y apoptosis. (Hardy, 2002; Díaz, 2009; Díaz, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

El SM se ha convertido en una de las entidades clínicas con mayor relevancia a nivel mundial debido a su alta incidencia y prevalencia además del incremento de casos en gran parte de la población mexicana. Según datos de la OMS, la prevalencia del SM está ligada directamente con el sobrepeso y la DMTII y representan un problema crítico de salud que junto con la HA, Dislipidemia y la RI condicionan a la aparición de este trastorno.

Actualmente el grupo de investigación de Treviño y cols., en el 2015 mostró en un modelo animal las características de este trastorno a base de una dieta hipercalórica/hiperglicémica, donde además se demostró que esta dieta puede inducir una respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, pérdida de población neuronal y déficit en la memoria aunque se sabe que estos factores pueden ser de riesgo para el desarrollo de la misma, aún se desconocen los mecanismos de cómo estas dos vías convergen.

Por otro lado se sabe que la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en zonas como el hipocampo y corteza cerebral en modelos animales propicia a la presencia de procesos inflamatorios, estrés oxidativo y muerte neuronal que en conjunto llevan a la pérdida de funciones cognitivas.

El presente estudio busca comprender que es lo que ocurre en un modelo animal de SM junto a la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata.

3. HIPÓTESIS

La inducción de síndrome metabólico en un modelo animal favorece la toxicidad del péptido amiloide- β_{1-42} .

4. OBEJTIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la inyección del péptido amiloide- β_{1-42} sobre los procesos inflamatorios y neurodegenerativos en ratas con síndrome metabólico.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

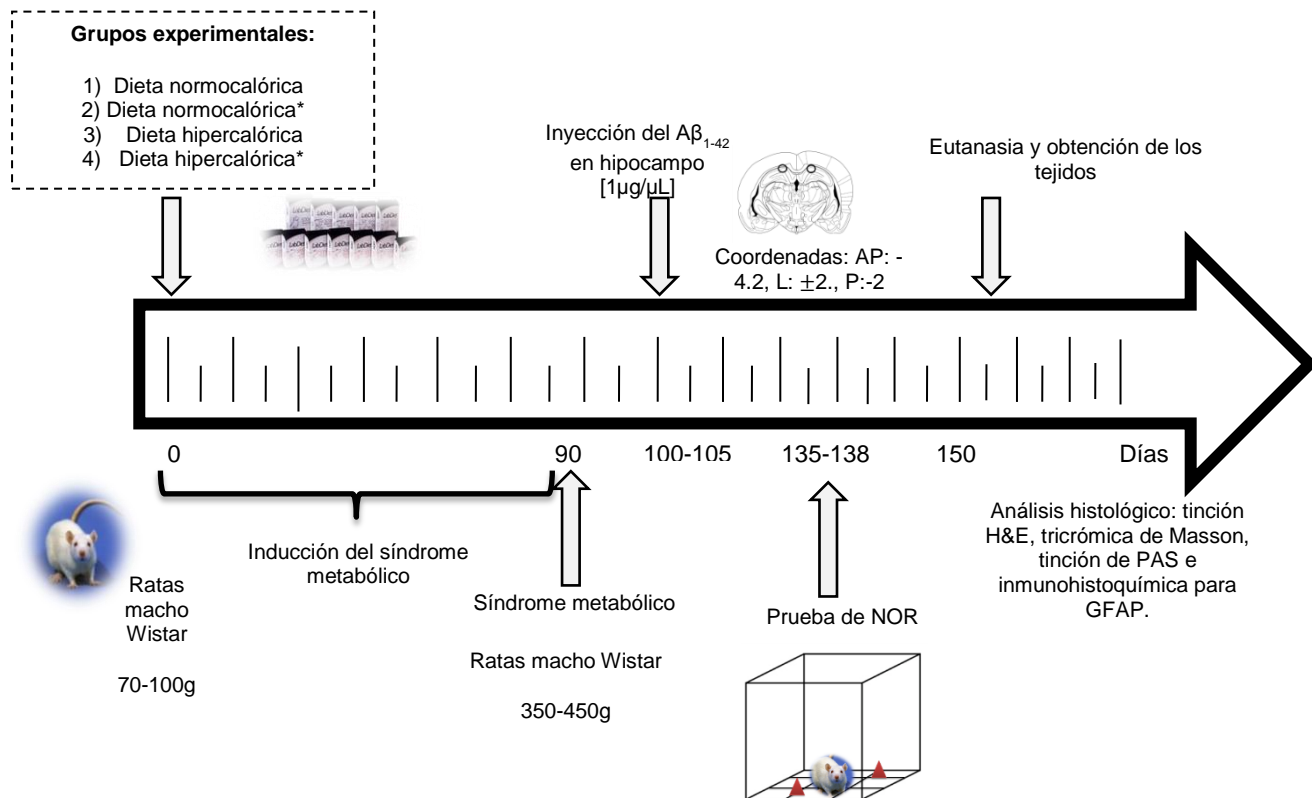
Analizar el efecto del péptido $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata sobre la memoria de corto y largo plazo en ratas con síndrome metabólico.

Evaluar la respuesta inflamatoria en el hipocampo de rata inducida por la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en ratas con síndrome metabólico.

Evaluar los marcadores de neurodegeneración en el hipocampo de rata inducidos por el péptido $A\beta_{1-42}$ en ratas con síndrome metabólico.

5. METODOLOGÍA

5.1 LÍNEA DE TRABAJO



5.2 Sujetos experimentales

Para desarrollar el modelo de SM se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 20 días, con un peso aproximado de 70-100g, procedentes del Bioterio “*Claude Bernard*” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas se mantuvieron en jaulas con libre acceso de agua y alimento, con un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas. Se dividieron en dos grupos: control con dieta normocalórica (DNC) cuyo alimento es suministrado por el bioterio (LabDiet 5001) y el grupo problema que se expuso a una dieta hipercalórica/hiperglicémica (DHC) (mx/e/2013/047377) durante 90 días, tiempo en el que se induce el síndrome metabólico (Treviño y cols 2015). El uso y cuidado de los animales se realizó bajo los criterios establecidos en la norma NOM-062-Z00-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Además, la sustentante obtuvo la

certificación para el manejo, uso y administración de animales de laboratorios expedida por el Bioterio “*Claude Bernard*” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Los sujetos de experimentación se dividieron en dos subgrupos:

- 1) Dieta normocalórica (n=4)
- 2) Dieta normocalórica + inyección del $A\beta_{1-42}$ en hipocampo(n= 4)
- 3) Dieta hipercalórica (n=4)
- 4) Dieta hipercalórica + inyección de $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo (n= 4)

5.3 Caracterización del SM

Tabla 1. Caracterización del SM

Peso	Medido con balanza
Perímetro abdominal	
Porcentaje de grasa corporal	$\%GC = (peso^{(0.33)}) \times 100$
Índice de masa corporal	$\frac{peso}{talla^2}$
Talla corporal	Distancia entre la base de su cola y su nariz.
Curva de tolerancia a la glucosa	Glucosa administrada de forma oral [75g/100mL/70Kg], mediciones a 0, 30, 60 y 90 minutos.
Glucosa basal	Técnicas colorimétricas
Lípidos totales	Técnicas colorimétricas
Triglicéridos	Técnicas colorimétricas
Ácidos grasos libres	Técnicas colorimétricas
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	Técnicas colorimétricas
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	Técnicas colorimétricas
Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)	Técnicas colorimétricas
Concentraciones de insulina	ELISA a 414nm
Concentraciones de insulina	Curva estándar (0-20UI/mL)

5.4 Preparación del $A\beta_{1-42}$

El $A\beta_{1-42}$ (Sigma-Aldrich) se diluyó en solución salina isotónica (SSI) y se almacenó en alícuotas de [1 μ g/ μ L], previo a la administración fue incubado a 37°C por 36 horas.

5.5 Cirugía estereotáxica

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina/xilacina (0.2mL/100g) por vía i.p. Posteriormente fueron colocados en el estereotáxico para pequeños roedores (Stoelting, Co) para realizar la microinyección en el hipocampo de forma bilateral de 5 μ L de SSI o 5 μ L de $A\beta_{1-42}$. Después de la cirugía los animales se mantuvieron en recuperación y observación bajo los cuidados postoperatorios correspondientes, administrando antibiótico y desinflamante durante 7 días.

Las coordenadas utilizadas para la microinyección fue de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1998) y fueron las siguientes: antero-posterior (AP) -4.2mm, lateralidad (L) \pm 2.1mm, profundidad (P) -2mm. La microinyección se realizó con la ayuda de una jeringa Hamilton de 10 μ L, una aguja (calibre 26) y una bomba de infusión (Stoelting) a una velocidad de 1 μ L/minuto.

5.6 Evaluación de la prueba de reconocimiento de objetos (NORt)

La NORt es una prueba de evaluación cognitiva en donde el objetivo es la evaluación de la capacidad para recordar características físicas de los objetos utilizados tales como forma, ubicación y textura (Ennaceur, 1991; Carlini, 2011).

La prueba se realiza en una habitación con luz roja con la ayuda de una caja de campo abierto (60cmx60cmx50cm) dentro de la cual se coloca al animal para comenzar la prueba.

Esta prueba consta de 3 fases:

Fase 1: los animales deben ser habituados, la rata se coloca dentro de la caja durante 6 minutos para su exploración sin objetos. Esta habituación es importante para que el animal se familiarice con el medio ambiente.

Fase 2 Aprendizaje: los animales se colocan dentro de la caja mirando hacia el centro y se exponen durante 5 min a dos objetos idénticos que se encuentran colocados en una posición

ya específica, para así permitir la exploración del animal durante el tiempo predeterminado. Se cuantifica el tiempo que el animal invierte para explorar cada uno de los objetos, al finalizar este tiempo la rata debe ser retirada de la caja y se debe limpiar.

Fase 2a memoria corto plazo: la fase se realiza dos horas después de la prueba de aprendizaje, se sigue el mismo protocolo sólo que uno de los dos objetos utilizados anteriormente se cambia.

Fase 2b memoria largo plazo: la fase se realiza 24 horas después de la evaluación de la memoria a corto plazo. Se sigue el mismo protocolo de la etapa anterior y se sustituye el objeto que previamente fue sustituido en la fase 2a.

5.7 Sacrificio y obtención de las muestras

Al finalizar las evaluaciones conductuales, los grupos experimentales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a la AVMA (the american veterinary medical association), cuyo objetivo es que se induzca al animal a un estado de inconsciencia rápida y muerte sin dolor.

Siguiendo con lo establecido en la línea de trabajo para las evaluaciones histológicas e histoquímicas se procedió a la perfusión intracardiaca de los animales evaluados y así la obtención de los cerebros.

Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilacina [0.20mL/100g] por vía ip, para ser perfundidos por perfusión cardiaca con solución buffer de fosfatos y paraformaldehído. Finalizada la perfusión se procedió a la eutanasia de los animales para extraer los cerebros y colocarlos en paraformaldehído al 4% para su preservación y evitar procesos de degradación celular durante 48 horas, los cerebros obtenidos se dividieron en tres partes para llevarlos a procesos de deshidratación, aclaración, infiltración e inclusión en parafina. El proceso de deshidratación consistió en colocar los cerebros en PBS para después de este tiempo colocarlos en concentraciones crecientes de alcohol (70, 80, 96 y 100%). La aclaración se realizó con soluciones de etanol-xilol (1:1) y xilol durante una hora en cada solución. La etapa de infiltración consistió en colocar los cerebros en parafina líquida, a una temperatura entre 48-52°C durante dos horas para incluirlos en bloques de parafina, en los cuales se procuró

localizar las zonas de interés para seccionar en rebanadas de 6 μ m de grosor y así finalmente montarlos en portaobjetos sialinizados para su posterior uso en las diferentes técnicas histológicas e histoquímicas.

5.8 Técnicas histológicas e histoquímicas

5.8.1 Tinción de hematoxilina-eosina

La tinción de hematoxilina-eosina (H&E) usada en la mayoría de estudios histológicos y patológicos utilizada para observar la morfología celular. El fundamento de la tinción radica en las propiedades acido-base de la célula, la hematoxilina es un colorante de carácter básico que tiñe al núcleo y la eosina de carácter ácido tiñe al citoplasma, así se determina si existen alteraciones en la morfología celular.

El protocolo de la tinción consistió en desparafinar las muestras con xilol y xilol/alcohol al 100%, rehidratar los tejidos en alcohol al 100, 96, 80 y 70% para teñirlos con hematoxilina de Mayer, después lavar con agua y teñir con eosina, las muestras se deshidrataron y aclararon en concentraciones crecientes de alcohol y xilol para el posterior montaje con resina. Los resultados muestran a los núcleos teñidos en azul y el citoplasma en color rojo o rosado.

La tinción de H&E permitió analizar y cuantificar el número de células viables en las regiones CA1, CA3 y GD del Hp. Para la cuantificación del número de células viables se tomaron las microfotografías correspondientes de las áreas de interés, esto con ayuda de una cámara (Leica/SM) en un objetivo de 40X, el número de células viables fue contabilizado a partir de cuatro laminillas por rata, sumando y sacando una media de la misma, para finalmente graficar el resultado. Para la visualización de las células se recurrió al uso del software Image-J.(ImageJ 1.47v).

5.8.2 Tinción de PAS

La tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS) se ha usado para la detección de carbohidratos y glicoproteínas, esta tinción pasa por distintas etapas que consisten en la deshidratación y rehidratación de los tejidos, para posteriormente fijar los tejidos e hidratarlos con una solución de ácido peryódico durante 15 minutos, se enjuagan las laminillas y se pasan al reactivo de

Schiff por 20 minutos, se enjuagan nuevamente y se aplica un baño con ácido clorhídrico el cual se enjuaga rápidamente y se contrasta posteriormente con hematoxilina de Harris 2 minutos, se enjuaga y se deshidratan las laminillas con alcohol y xilol para así finalmente montar en un medio resinoso para la observación en el microscopio. Los resultados muestran sustancias positivas al PAS los núcleos en color azul-morado, la presencia de glucógeno, mucinas en un rojo.

5.8.3 Tinción Tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson sirve para apreciar sustancias intracelulares fibrosas. El protocolo para llevar a cabo esta tinción consiste en tres etapas: la primera consiste en deshidratar y rehidratar los tejidos en baños de xilol, xilol-alcohol, alcohol 100, 96, 80, 70%, y agua. Posteriormente se deben tratar con líquido Bouin durante una hora con una temperatura de 56°C se deja enfriar por 10 minutos y lavar con agua hasta que se aclaren los tejidos, en la segunda etapa los tejidos se colorean con una solución de hematoxilina férrica de Weirgert durante 10 minutos transcurrido este tiempo enjuagar con agua, se sigue con la coloración con una solución de Fucsina ácida-escarlata de Briebrich durante 15 minutos, después enjuagar con agua para colocar los tejidos en una solución de ácido Fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 15 minutos posterior a esto los tejidos se colocan en azul de anilina por 15 minutos, finalizado este tiempo enjuagar con agua, en una tercera etapa los tejidos se colocan en ácido acético al 1% por un minuto y finalmente los tejidos se deshidratan y aclaran con baños de alcohol y xilol para finalmente montar con un medio resinoso y así observar en microscopio. Los resultados se observan con la coloración en negro del núcleo, de color rojo musculo, citoplasma y queratina.

5.8.4 Inmunihistoquímica para GFAP

La inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia se siguió en tres etapas: en la primera etapa los tejidos se sometieron a desparafinar con xilol y rehidratar con alcohol en porcentajes decrecientes (100-70%) hasta llegar a agua destilada. Posteriormente las laminillas fueron sometidas a lavados con PBS y al bloqueo de epítopes con albúmina sérica de bovino (BSA) al 2%, durante 30 minutos en cámara húmeda. El siguiente paso fue colocar Tritón al 0.2% en PBS durante 10 minutos y acto seguido los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario

toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-GFAP (1:500 en PBS) (goat antirabbit/Sigma Aldrich). La segunda etapa consistió en lavar con PBS y colocar el anticuerpo secundario Fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) durante 2 horas en cámara húmeda y en oscuridad. Se montaron finalmente con medio Vecta-Shield conjugado con DAPI (4,6-diamino-fenil-indol). Para la observación y análisis de la inmunoreactividad de los anticuerpos de las regiones de interés se realizó en un microscopio (Leica/DMSL) acoplado a una lámpara de mercurio y con filtros rojo, azul y verde, este también acoplado a una cámara donde las imágenes capturadas fueron en el objetivo 40X. El número de neuronas analizadas fue contado por cada 4 laminillas de cada rata y analizado con el software Image-J (ImageJ 1.47v).

5.9 Análisis estadístico

Para la cuantificación del número de células viables en las regiones CA1, CA3 y GD del Hp se contabilizaron cuatro laminillas por rata, utilizando el programa Image J (Image J 1.47v), sumando y sacando la \pm ESM de cada grupo en cada región. La diferencia estadística se obtuvo con una ANOVA de una vía de medidas repetidas con una pos prueba Bonferroni * $p < 0.05$.

La prueba de NORt se graficó el promedio \pm ESM de cada grupo. Se graficó el índice de discriminación entre el tiempo de exploración del objeto familiar y el objeto novedoso en cada grupo. La diferencia estadística se obtuvo con un ANOVA de una vía y una * $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 La inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata disminuye el aprendizaje en un modelo de SM

30 días posteriores a la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ fue evaluado el proceso de aprendizaje en el NORt, dónde se observó que los animales a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ no discriminaban de los dos objetos familiares. Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba pos-Bonferroni y mostró que el péptido $A\beta_{1-42}$ causa déficit en el aprendizaje en los grupos con la inyección pero no en los grupos control, (figura 19), se observa la comparación entre el grupo SSI y $A\beta$ dónde $***p < 0.001$ y los grupos SM y SM+ $A\beta_{1-42}$ con $**p < 0.01$, estos datos sugieren que la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ después de 30 días disminuye el aprendizaje en un modelo de SM, comparando estos grupos no existen diferencias significativas entre sí, por otro lado en los grupos controles SSI y SM no existen diferencias significativas entre ellos y estos grupos en este proceso pueden discriminar entre dos objetos que son iguales.

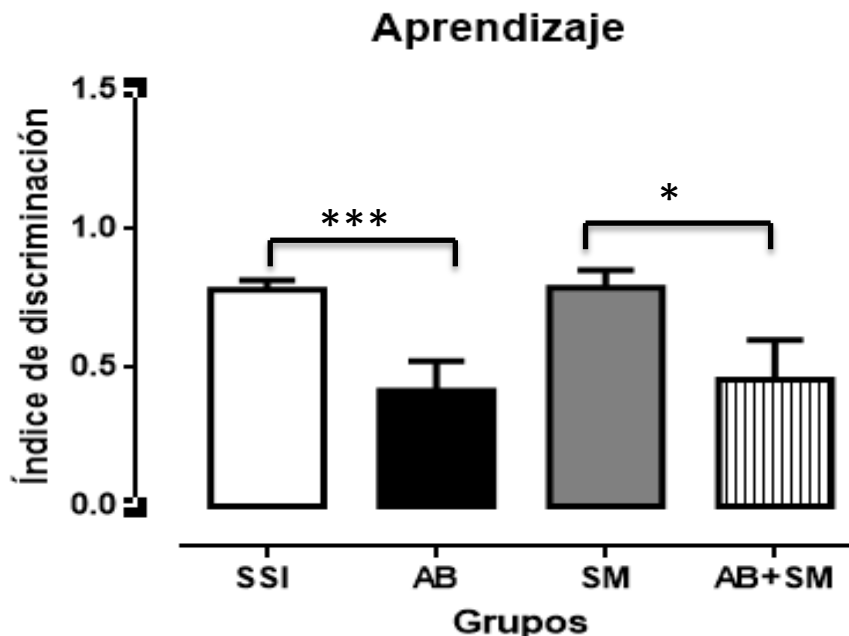


Figura 19. La inyección del $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata en un modelo de SM disminuye el aprendizaje. Los valores mostrados en el grupo $A\beta$ (barra negra) muestran una disminución progresiva en el índice de discriminación en la prueba del NORt respecto al grupo SSI (barra blanca), comparando el grupo SM (barra gris) respecto al grupo del $A\beta+SM$ (barra rayada) se muestra también una disminución, evidenciando el daño en el modelo de SM, el análisis fue con una $n=4$ animales por grupo y valores de $*p < 0.05$ como significativos. ANOVA de una vía, con post -Bonferroni.

6.2 La inyección del $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de disminuye la memoria a corto en un modelo de Síndrome metabólico.

Posterior a la prueba de aprendizaje 2 horas después se hizo la evaluación de la memoria a corto plazo, se observó que los animales que tenían la inyección del péptido no discriminaban del objeto novedoso y del objeto familiar (figura 20). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba post-Bonferroni y mostró que la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ disminuye la memoria a corto plazo en los grupos problema respecto a los controles. Se observa la comparación entre el grupo SSI y $A\beta_{1-42}$ donde $**p<0.01$ mientras que la comparación entre el grupo SM y SM+ $A\beta_{1-42}$ $*p<0.01$, estos datos sugieren que la memoria a corto plazo se ve disminuida en un modelo de SM, aunque la comparación entre el grupo $A\beta_{1-42}$ y el grupo SM+ $A\beta_{1-42}$ no arroja resultados significativos. En los grupos controles no existen diferencias significativas ya que la memoria a corto plazo no se ve afectada.

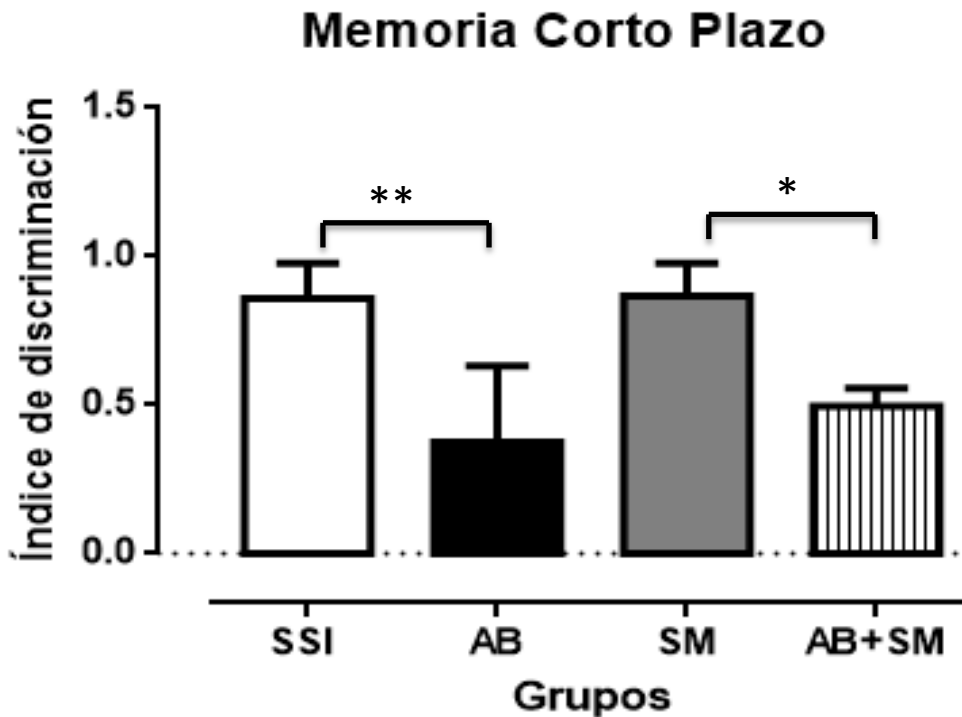


Figura 20 La inyección del $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata en un modelo de SM disminuye la memoria a corto plazo. Se muestra la comparación entre el grupo $A\beta$ (barra negra) respecto al grupo SSI (barra blanca), donde se observa una disminución en el índice de discriminación en la prueba del NORt, comparando el grupo SM (barra gris) respecto al grupo del $A\beta$ +SM (barra rayada) también se observa una disminución demostrando el daño en el modelo de SM, el análisis fue con una $n=4$ animales por grupo y valores de $*p<0.05$ como significativos. ANOVA de una vía, con post-Bonferroni.

6.3 La inyección del $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de disminuye la memoria a largo plazo en un modelo de Síndrome metabólico.

24 horas después se hizo la evaluación de la memoria a largo plazo, se observó que los animales con la inyección del péptido no discriminaban el objeto novedoso del familiar (figura 21). Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba post –Bonferroni y se mostró que la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ disminuye la memoria a largo plazo, esto cuando se hizo la comparación de los grupos SSI y $A\beta_{1-42}$ dónde $**p<0.01$ y la comparación entre los grupos SM y SM+ $A\beta_{1-42}$ dónde $**p<0.05$, estos datos apuntan que la memoria a largo plazo se ve disminuida en un modelo de SM, la comparación entre ambos grupos $A\beta_{1-42}$ y SM+ $A\beta_{1-42}$ no arrojan datos significativos, lo mismo pasa en los grupos control donde no existen diferencias significativas dónde la memoria a largo plazo no se ve afectada.

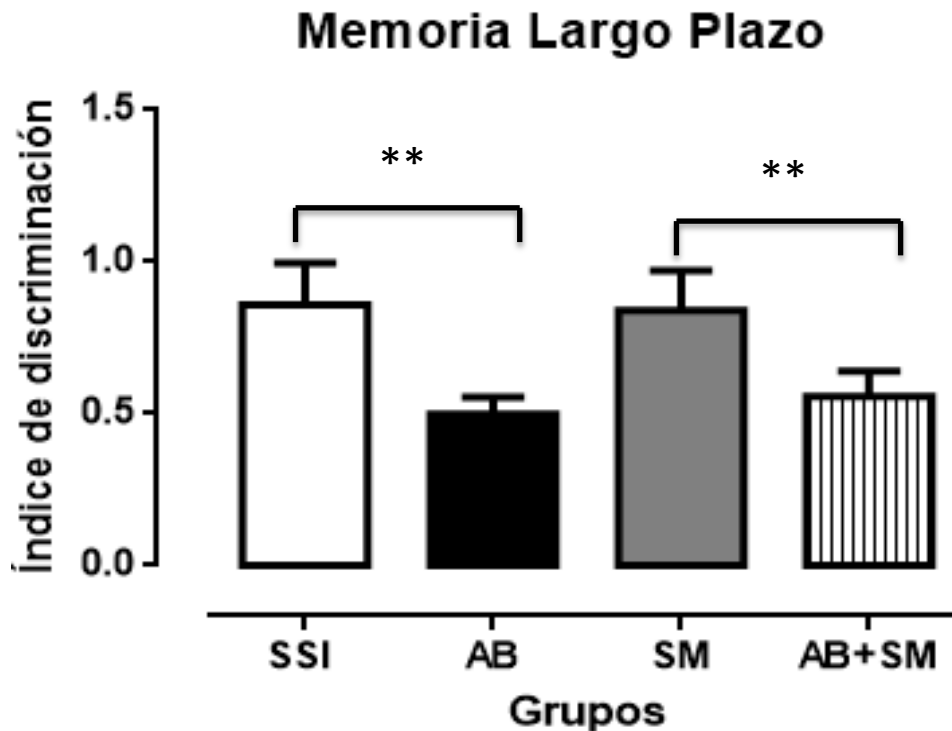


Figura 21. La inyección del $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata en un modelo de SM disminuye la memoria a largo plazo. Se muestra la comparación entre el grupo $A\beta$ (barra negra) respecto al grupo SSI (barra blanca), donde se observa una disminución en el índice de discriminación en la prueba del NORt, esto también se observa comparando el grupo SM (barra gris) respecto al grupo del $A\beta$ +SM (barra rayada) demostrando el daño en el modelo de SM, el análisis fue con una $n=4$ animales por grupo y valores de $*p<0.05$ como significativos. ANOVA de una vía, con post –Bonferroni.

6.4 Efecto la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en un modelo de Síndrome Metabólico sobre la morfología y estructura celular

La morfología y estructura celular fueron analizadas con la tinción H&E dónde se evidencio la atrofia y el daño celular ocasionado en los grupos $A\beta_{1-42}$ y SM+ $A\beta_{1-42}$, en estos grupos además se observó una disminución en el número de células, ya que al contabilizarlas se contaron como viables aquellas que tuvieran el núcleo y citoplasma definido y se discriminó aquellas que no cumplieran con este parámetro.

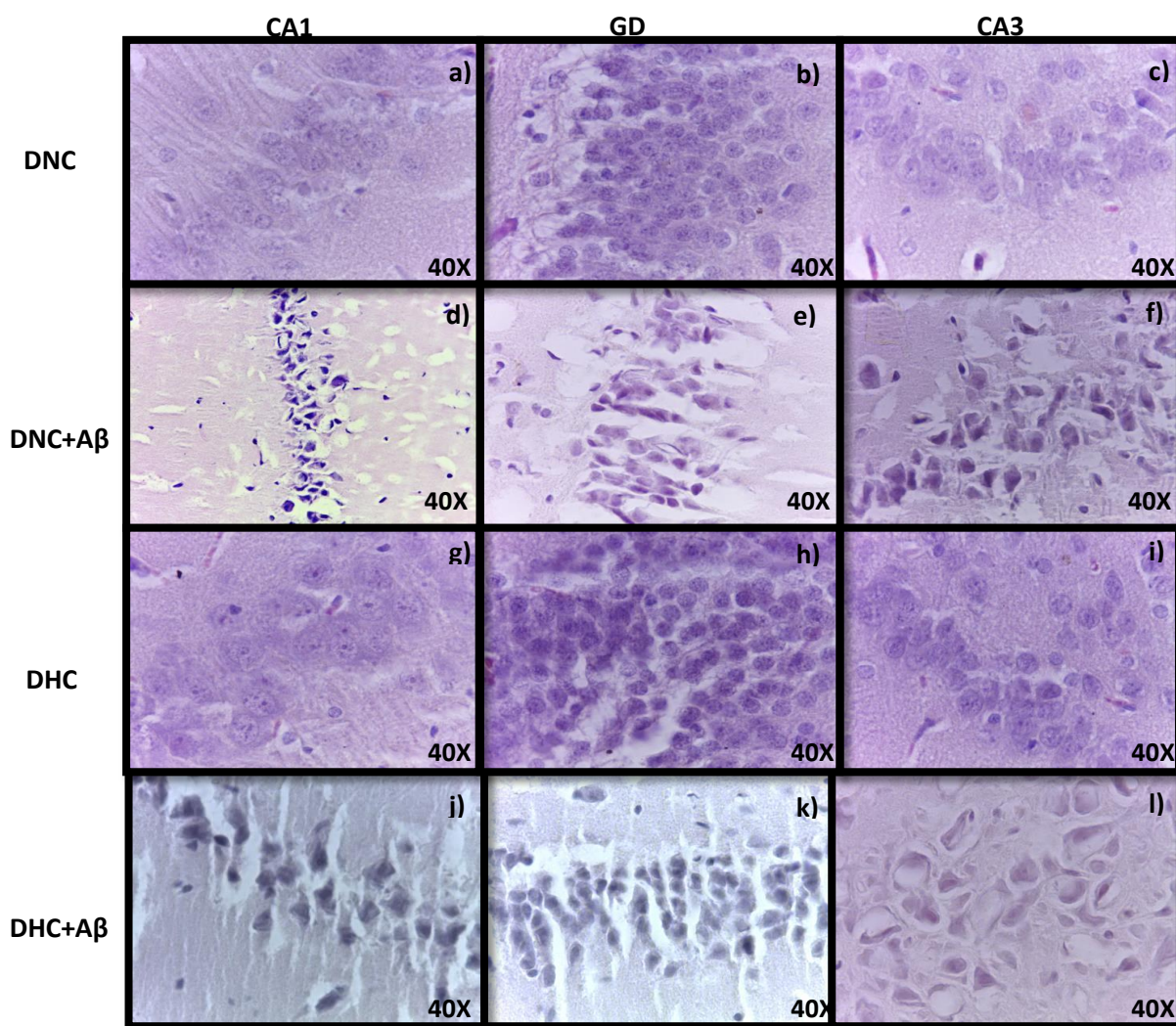


Figura 22. Se muestran las fotomicrografías correspondientes a la tinción Hematoxilina-Eosina en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo, donde se puede observar la morfología celular, en los grupos control (a, b, c, g, h, i) se puede observar una regularidad de las células mientras que en los grupos con $A\beta$ (d, e, f, j, k, l) no se observa, mostrando el daño ocasionado por el péptido. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.

6.4.1 Cuantificación de células viables en las regiones CA1, CA3 y GD en un modelo de Síndrome metabólico después de la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$.

Se muestra la cuantificación de células en las regiones CA1, CA3 y GD dónde se observó una disminución en el número de éstas.

los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba post – Bonferroni y se mostró que en los grupos $A\beta_{1-42}$ y SM+ $A\beta_{1-42}$ el número de células viables (con núcleo y citoplasma definido) se ven claramente disminuidas en comparación con los grupos controles, dónde **** $p < 0.0001$, estos datos aportan evidencia del daño y la muerte celular en estas zonas.

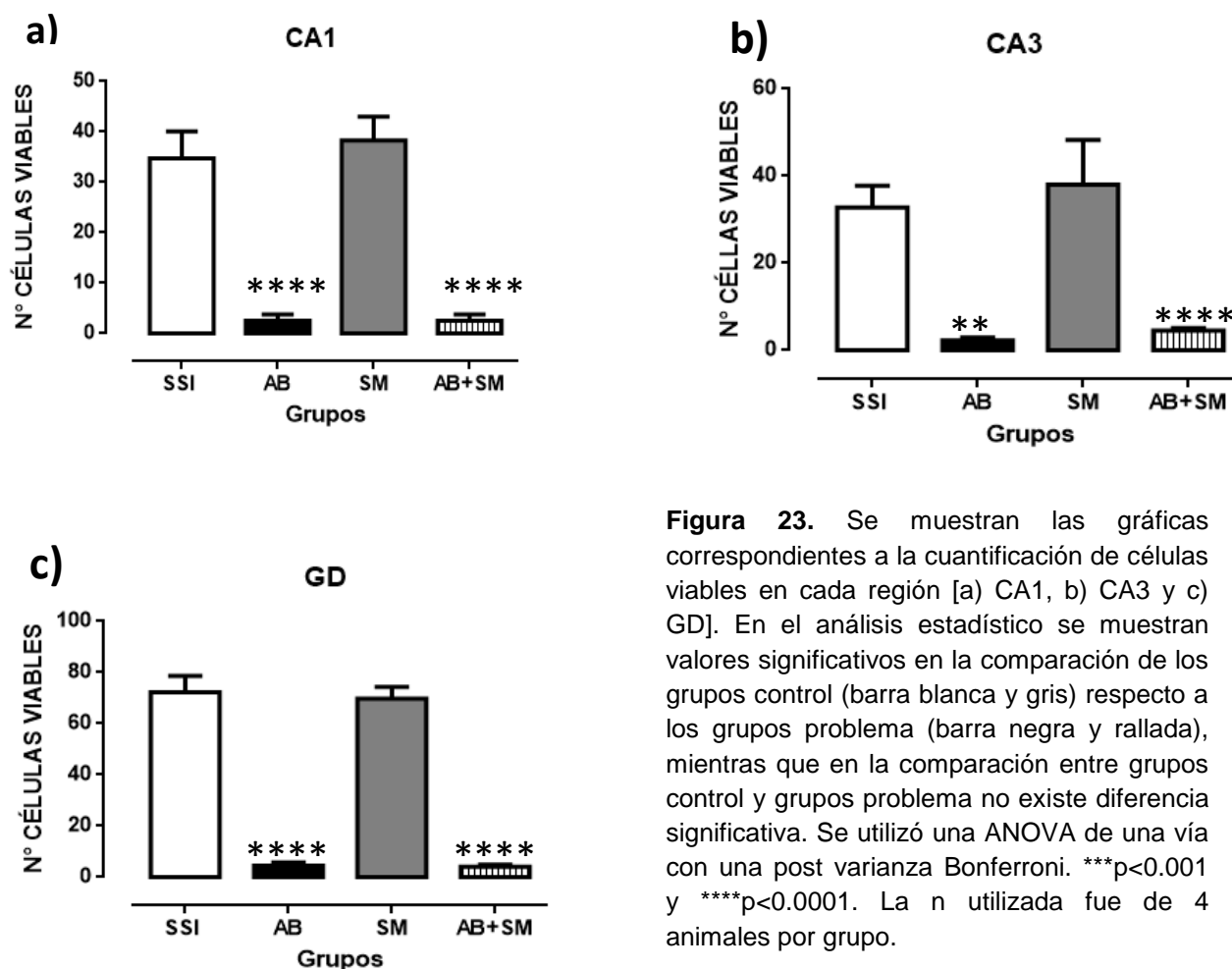


Figura 23. Se muestran las gráficas correspondientes a la cuantificación de células viables en cada región [a) CA1, b) CA3 y c) GD]. En el análisis estadístico se muestran valores significativos en la comparación de los grupos control (barra blanca y gris) respecto a los grupos problema (barra negra y rallada), mientras que en la comparación entre grupos control y grupos problema no existe diferencia significativa. Se utilizó una ANOVA de una vía con una post varianza Bonferroni. *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. La n utilizada fue de 4 animales por grupo.

6.5 La inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ afecta directamente la estabilidad de los carbohidratos y proteínas en un modelo de Síndrome Metabólico

Se muestra la tinción de PAS que pone de manifiesto la presencia de carbohidratos libres o conjugados que forman a las células, lo observado es en los grupos control (DNC y DHC) la presencia de los núcleos y estructuras como polisacáridos y glicoproteínas en un color azul morado y lila, mientras que en los grupos problema (DNC+A β_{1-42} y DHC+A β_{1-42}) no se aprecia el contraste debido a que a estos grupos al inyectarles el péptido A β_{1-42} el mecanismo de toxicidad del péptido condiciona a eventos como estrés oxidativo y muerte celular que afecta la estabilidad de carbohidratos y estructuras proteicas por lo que la expresión y unión del colorante a ciertas proteínas se ve inhibida y la tinción no se aprecia.

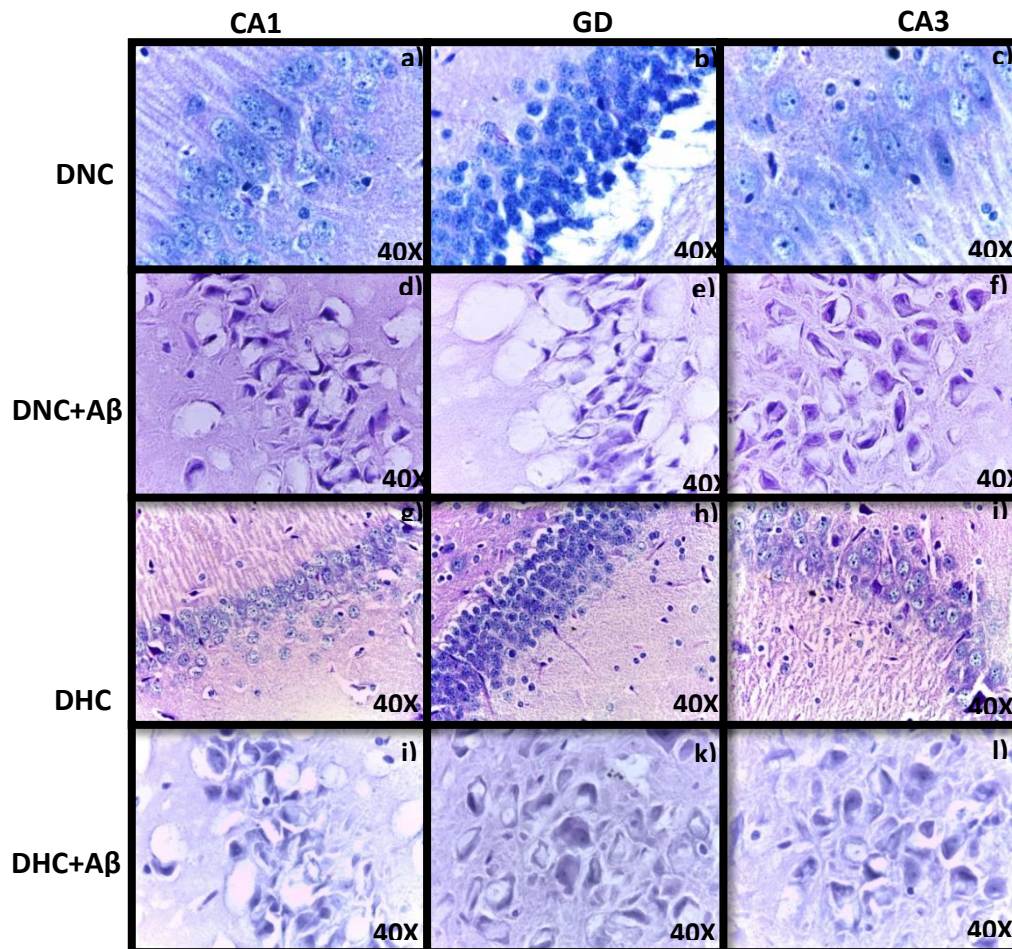


Figura 24. Se muestran las fotomicrografías correspondientes a la tinción de PAS en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo, donde observamos un contraste en los grupos control DNC y DHC (a, b, c, g, h i) mientras que los grupos problema DNC +A β y DHC+A β (d, e, f, j, k, l) no se aprecia este contraste evidenciando el daño ocasionado por la inyección del péptido en un modelo de SM. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.

6.6 La inyección el péptido $A\beta_{1-42}$ en un modelo de Síndrome Metabólico afecta directamente estructuras de colágeno y potencia procesos inflamatorios

Se muestra la tinción Tricrómica de Masson que revela la presencia de estructuras fibrosas, los grupos (DNC y DHC) muestran en color negro el núcleo y ligeramente en un tono rosáceo a rojizo su citoplasma, las fibras de colágeno deben tener un color azul que no se percibió en el panel mostrado. En los grupos problema (DNC + $A\beta_{1-42}$ y DHC + $A\beta_{1-42}$) se percibe un ligera coloración, debido a la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ cuya toxicidad enciende procesos inflamatorios inhibiendo la presencia de esta coloración en procesos patológicos.

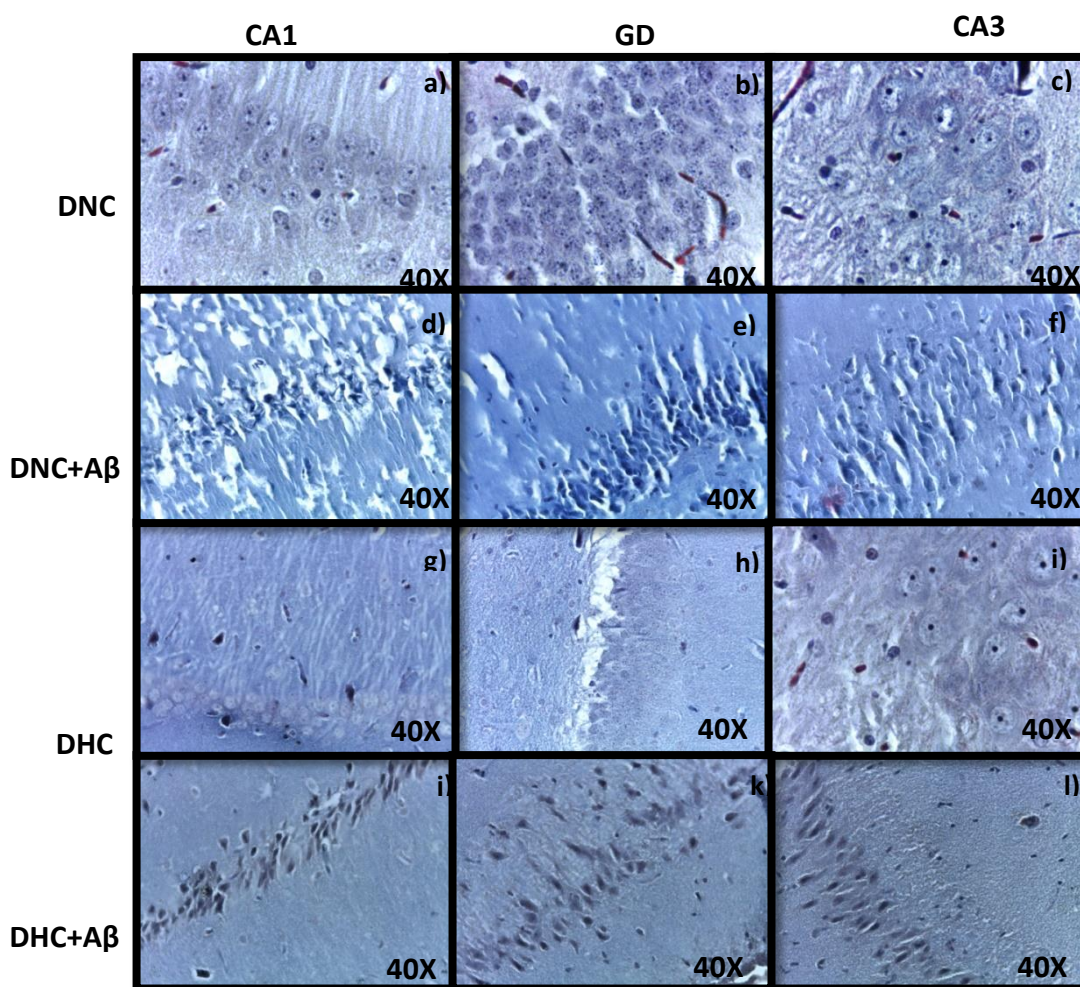


Figura 25. Se muestran las fotomicrografías correspondientes a la tinción Tricrómica de Masson en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo, donde observamos la presencia de estructuras colágenas en color azul lo cual no se apreció, se observa que en los grupos control DNC y DHC (a, b, c, g, h, i) la coloración de núcleos y citoplasma, mientras que en los grupos problema DNC + $A\beta$ y DHC + $A\beta$ (d, e, f, j, k, l) esta coloración tampoco se aprecia y los núcleos y citoplasma no se ven definidos. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.

6.7 La inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en un modelo de Síndrome Metabólico aumenta la inmunorreactividad a GFAP

Se muestra el panel correspondiente a la inmunohistoquímica por fluorescencia a GFAP donde se observa una marcada inmunorreactividad a GFAP que nos habla de la sobreactivación de la glía como resultado de procesos inflamatorios. En los grupos controles (DNC y DHC) no se ve expresión de la proteína, mientras que los grupos problema (DNC+ $A\beta_{1-42}$ y DHC + $A\beta_{1-42}$) la expresión es muy evidente.

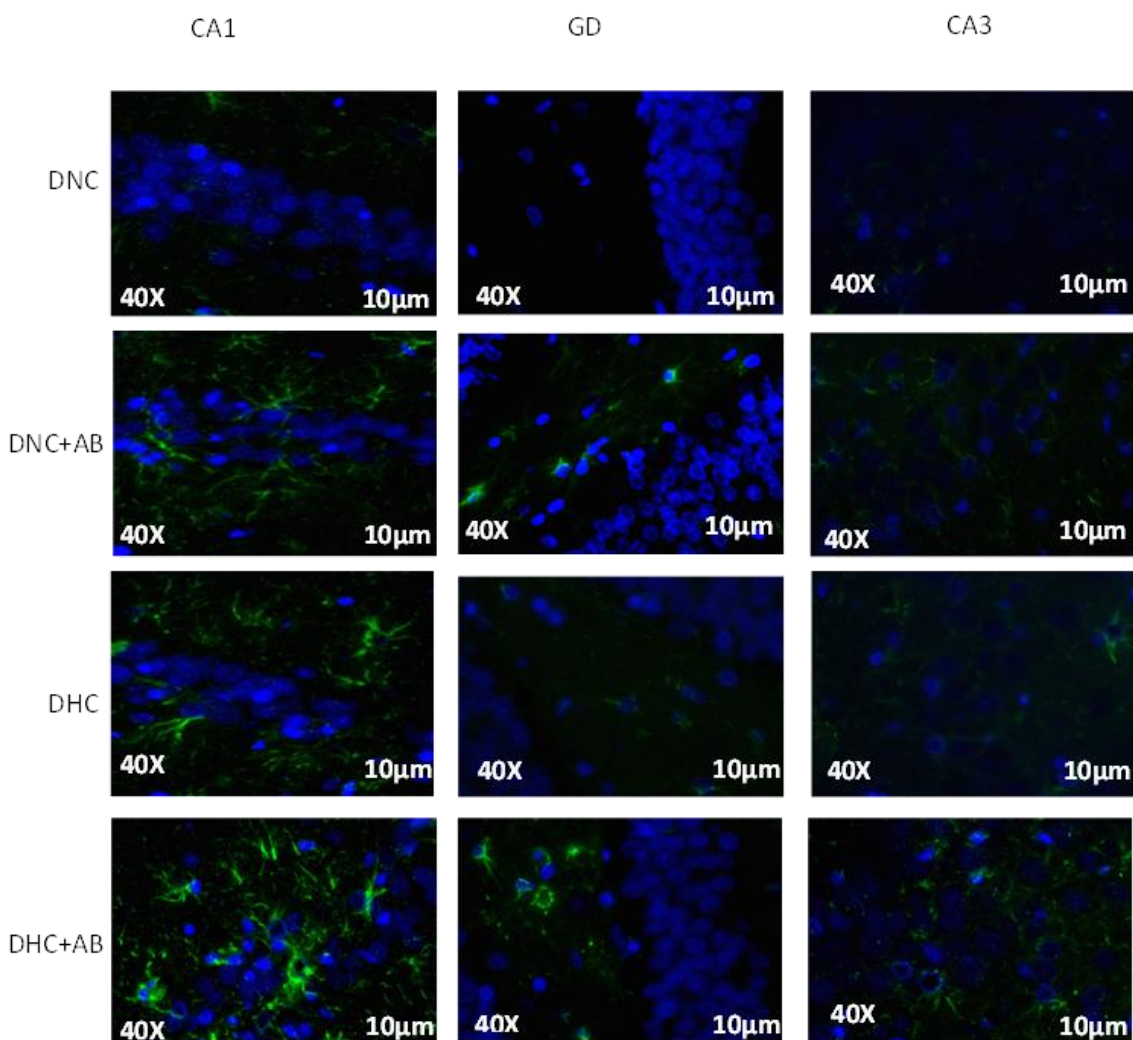


Figura 26. Se muestran las fotomicrografías correspondientes a la inmunohistoquímica para GFAP en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo donde se observa la presencia de una mayor inmunorreactividad para GFAP en los grupos problema (DNC + $A\beta$ y DHC+ $A\beta$) respecto a los grupos control (DNC y DHC). La fluorescencia para GFAP fue marcada con **FICT** y los núcleos teñidos con **DAPI**. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La EA es un padecimiento que afecta alrededor de 36 de millones de personas a nivel mundial, es un trastorno neurodegenerativo, progresivo e irreversible que se caracteriza fundamentalmente por una pérdida masiva de las funciones cognitivas (Selkoe, 2001). Procesos como el aprendizaje y la memoria son los más afectados (Buffalo, 2006; Malcolm, 2001).

Desde hace algunas décadas, científicos a lo largo de la historia y en todo el mundo han estudiado las características fisiopatológicas de esta enfermedad, desde observar las características en los pacientes afectados hasta la reproducción de la misma en modelos animales, donde de forma genética o con la inyección de algún agente tóxico (Hardy, 2009) se imita la mayoría de las características de la enfermedad, con el fin de buscar una posible causa, probar algunas alternativas terapéuticas y/o conocer las vías de señalización involucradas en el desarrollo de la enfermedad o que pudiesen incrementar el riesgo de la misma (Halliwell, 2006; Gonzalo, 1999).

En la actualidad se cree que padecimientos sistémicos como la DMTII, obesidad, y el SM son factores de riesgo (Freeman, 2011; Watts, 2013) para la EA (Pasinetti, 2008). En investigaciones recientes grupos de trabajo han mostrado evidencia de que una dieta rica en carbohidratos y en grasas saturadas influye de manera directa en procesos de aprendizaje y de memoria (Granholm, 2008). Recientemente se desarrolló un modelo experimental de SM dónde se vio una neurodegeneración en hipocampo y corteza temporal (Treviño, 2015) y la disminución de enzimas antioxidantes, el aumento de estrés oxidativo y peroxidación lipídica (García, 2015).

El propósito del siguiente proyecto fue evaluar en un modelo animal de SM más la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata los procesos de aprendizaje y memoria en la prueba de NORt así como la visualización del daño celular, a través de algunas técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

El primer resultado obtenido en este trabajo fue el encontrado en la prueba NORt, que evalúa los procesos de aprendizaje y de memoria a corto y largo plazo durante un determinado

periodo de tiempo (Ennaceur, 1988; Barker, 2007), dónde se observó que se ve una marcada disminución en estos procesos, pero no existe una diferencia significativa entre ambos grupos, lo que nos puede decir que el efecto de la DHC no tuvo una relevancia significativa en la evaluación, probablemente el efecto de la dieta no se ve acentuado en la evaluación de este tipo de memoria o el efecto de la misma junto con la inyección del $A\beta_{1-42}$ durante un tiempo determinado no arrojan un resultado más específico.

En la EA la pérdida y muerte neuronal se han reportado en regiones como el hipocampo, corteza temporal y corteza frontal, ésta pérdida neuronal inducida por la toxicidad del $A\beta$ genera estrés oxidativo (Parris, 2005), bien se sabe que en condiciones de estrés oxidativo existen niveles bajos de antioxidantes así como una elevada concentración de radicales libres y ácidos grasos que condicionan a la alteración de la estructura celular e inducir su muerte (García, 2015).

En el panel de microfotografías la figura 22 se muestra la tinción H&E dónde se evidencia el daño celular en las regiones de CA1, CA3 y GD del hipocampo en los grupos tratados con $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-42}$ + DHC (SM), donde la estructura celular se ve alterada y se observa una basofilia (Álvarez, 2008) esta basofilia se observa en la EA en los componentes de placas neuríticas y marañas neurofibrilares (Troncoso, 2006).

La EA también genera una respuesta inflamatoria por la toxicidad del $A\beta$ que induce a la activación de la microglía y astrocitos que secretan citocinas proinflamatorias que inducen la afinidad neuronal por radicales libres que aumentan la citotoxicidad y la neuroinflamación (Díaz, 2009; Manzano, 2006).

Los resultados que muestran una respuesta de tipo inflamatoria son las microfotografías de las figuras 24, 25 y 26 dónde las tinciones PAS, tricrómica de Masson y la inmunohistoquímica para GFAP muestran estos procesos.

La tinción de PAS que sirve para poner de manifiesto estructuras proteicas y carbohidratos, también se ha visto en estudios sobre el envejecimiento dónde se da la formación de gránulos y también se observan en enfermedades neurodegenerativas y en padecimientos como melanomas dónde se percibe la disminución en la estabilidad de estas estructuras (Warso,

2001). Esta disminución en la estabilidad que se ve también en padecimientos periféricos como DMTII se debe a la generación de productos avanzados de glicación (AGES), la presencia de estrés oxidativo y de procesos de tipo inflamatorio (Shi Du, 1994; Vlassara 1994,) por otro lado la presencia de AGES también se ve en la EA y actualmente se ha relacionado con la presencia de SM (Cai, 2014). Lo que nos sugiere que en un evento como lo es la inducción del SM más la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ la presencia de AGES aumenta eventos como el EO y la presencia de procesos inflamatorios que hacen que la estabilidad de las estructuras celulares se vea nula.

La tinción tricrómica de Masson revela la presencia de estructuras fibrosas como colágeno que se aprecia de manera fisiológica en procesos como cicatrización o aumentada en procesos patológicos como la inflamación y enfermedades autoinmunes, además de que en enfermedades como la EA, Parkinson o la esclerosis múltiple (Coronato, 2012). Procesos que también se ven aumentados también en la DMTII y SM (Shi Du, 1994). El aumento de especies oxidantes y la disminución de enzimas antioxidantes en procesos como la DMTII, SM y EA condicionan el aumento de AGES y EO. Lo que sugiere que en el SM más la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ la presencia de colágeno ante un fenómeno como la lesión en estas ratas se vea aumentada por dicha lesión, en las ratas que sólo tenían SM probablemente también la presencia de colágeno se ve aumentada resultado de un inflamación sistémica ocasionado por el SM.

Bien se sabe que la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ aumenta la cantidad de especies oxidantes, la nitración de proteínas, aumento en la activación de mecanismos de defensa y el incremento en la activación de astrocitos ocasionados por procesos inflamatorios (Díaz, 2009; Limón, 2009). Los astrocitos en condiciones patológicas responden a la presencia de sustancias oxidantes como el NO llevando a un daño neuronal y glial aumentando procesos metabólicos en respuesta a la falta de ATP, este procesos contribuye al aumento del EO, peroxidación lipídica y nitración de proteínas que se han encontrado en la EA (Parks, 2001). la sobreproducción de NO puede generar agentes tóxicos como el peroxinitrito ($ONOO^-$) que contribuye a daño neuronal y alterar el metabolismo energético, esta sobreproducción de NO se puede producir por los astrocitos y la microglía a través de la sintasa de óxido nítrico de

tipo inducible (iNOS) (Mattson, 2004) dónde se ha visto que en pacientes con EA la sobreexpresión de iNOS (Haas, 2002) que nos lleva a la pérdida de funciones cognitivas. Por otro lado los astrocitos secretan a una proteína muy importante la GFAP que se ve expresada ante procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas que se asocia con la sobreactivación de astrocitos y la pérdida neuronal. Como se ve en el panel de la inmunohistoquímica para GFAP la expresión de esta proteína se ve en los grupos DHC, $A\beta_{1-42}$ y DHC+ $A\beta_{1-42}$, ya que en estos existe la presencia de procesos de tipo inflamatorio que aumenta la expresión de esta proteína. Se sugiere que un evento como el SM que enciende procesos inflamatorios y oxidativos expresa a GFAP y más la inyección del $A\beta_{1-42}$ estos procesos se ven doblemente marcados y que por ende nos llevarán a la pérdida de funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria.

Por lo tanto, los resultados del presente trabajo aportan evidencias del impacto del síndrome metabólico y la toxicidad del $A\beta$ en las funciones cognitivas.

8. ESQUEMA HIPOTÉTICO

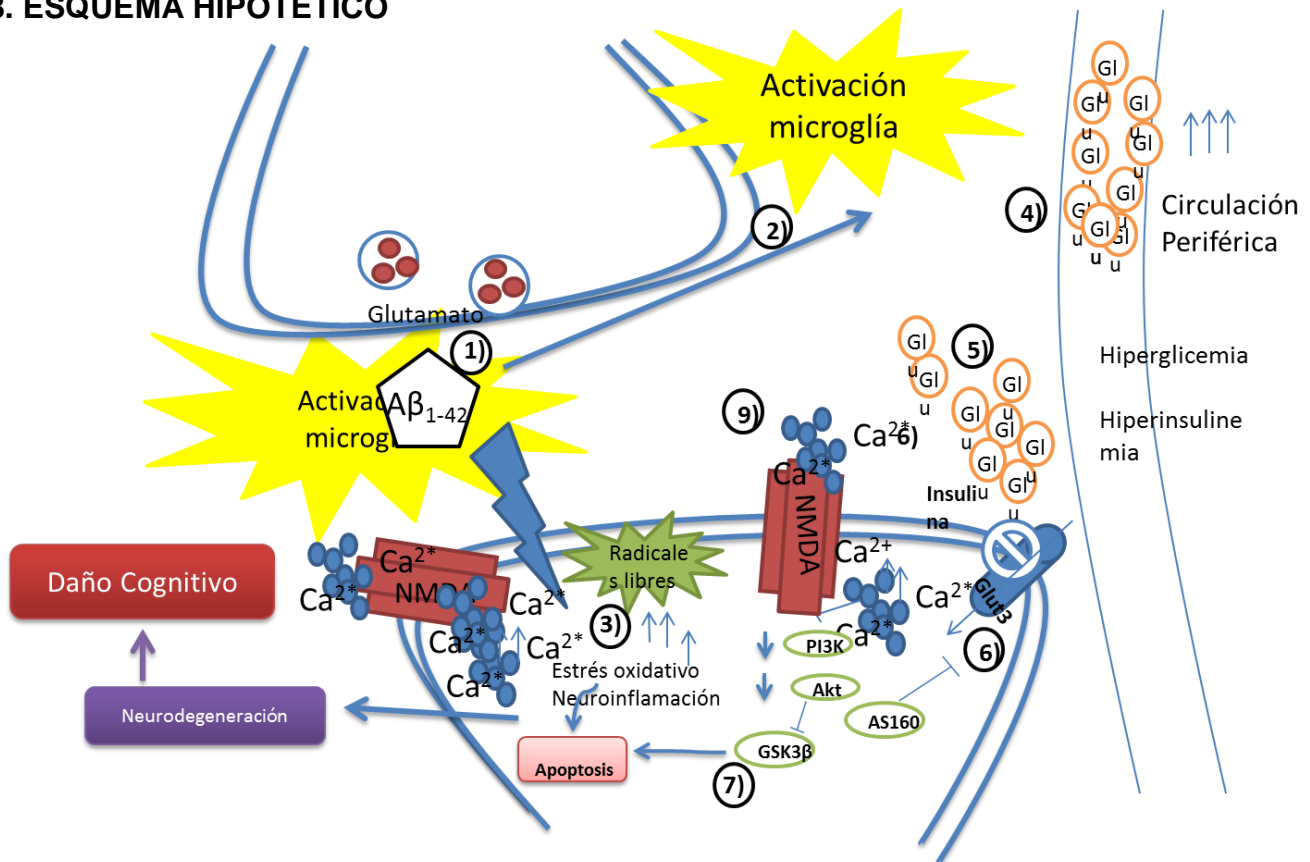


Figura 27. Esquema hipotético. La inyección hipocámpica del péptido $A\beta_{1-42}$ causa la muerte progresiva de neuronas glutamatérgicas en el hipocampo (2) que a su vez llevan a la activación de la microglía, estrés oxidativo, neuroinflamación y apoptosis (3). Este evento junto a la excesiva circulación periférica (4) y en el cerebro de glucosa (5) que disminuyen la entrada de glucosa a la célula (6) evitando la cascada de señalización a las vías PI3K/Akt (7), al no activarse la vía de la Akt esta no se une a su sustrato y evita la entrada de glucosa a la célula (8), por lo que existe un exceso de glucosa extracelular, y así mantener un estado que condiciona un estrés y daño celular constante. Por otro lado la entrada masiva de Ca^{2+} condiciona a la aparición de radicales libres y la aparición de estrés oxidativo e inflamación, lo que llevará a muerte celular y aun deterioro cognitivo que impide el favorecimiento de tareas como el aprendizaje y la consolidación de la información.

9. CONCLUSIÓN

La inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de rata con SM:

- Induce un deterioro de la memoria de reconocimiento de corto y largo plazo
- Ocasiona una astrogliosis reactiva que trae como resultado exacerbar la respuesta inflamatoria a nivel hipocampal
- Promueve el deterioro de la estructura y función de la región CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratas.

10. PERSPECTIVAS

- Cuantificar los parámetros de SM en un modelo animal después de la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$.
- Evaluar marcadores de muerte celular posteriores a las pruebas de aprendizaje y memoria.
- Evaluar los efectos del SM más la inyección del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la arborización dendrítica.

11. Referencias

- Alegría E**, Cordero A., Laclaustra M., Grima A., León M., et al. 2005. Prevalencia del síndrome metabólico en población laboral española: registro MESYAS. *Revista Española de Cardiología*. 58 (7):797-806
- Álvarez M.**, Pedrosa I., de la Fe A., Padrón A., Álvarez M., and Álvarez L. 2008. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista mexicana de neurociencia*. 9(3): 196-201
- Barazzoni R.**, Zanetti M., Ferreira C., et al. 2007. Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 92. 3935-3940
- Barker G.**, Bird F., Alexander V., and Warburtun E. 2007. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *The journal of Neuroscience*. 27(11):2948-2957.
- Bays H.**, Toth P., Etherton K., Abate N., et al. 2013. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: A consensus statement from the National Lipid Association. *Journal of Clinical Lipidology*. 7: 304-383.
- Biessels G.**, Kamal A., Ramakers G., Urban I., Berrie M., et al. 1996. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 45: 1249-1266.
- Blennow K.**, de Leon M., and Zetterberg H. 2006. Alzheimers disease. *The lancet*. 368. 387-403
- Brookmeyer R.**, Johnson E., Ziegler-Graham K., and Michael H. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimers disease. *Work* bepress. (23)
- Buffalo E.**, Bellgowan P., and Martin A. 2006. Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. *Learning and memory*. 13. 638-643
- Butterfield A.**, Swomley A., and Sultana R. 2013. Amyloid B-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxidants and Redox Signaling*. 19(8): 823- 835.
- Cade WT.** 2008. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Journal of the american physical therapy association*. 88(11): 1322-1335
- Cai W.**, Uribarri J., Zhu L., Chen X., Swamy S., et al. 2014. Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proceedings of the national academy of sciences*. 111(13):4940-4945.

Carlini V. 2011. The object recognition task: a new proposal for the memory performance study. *Intechopen*. 27-42

Carrillo R., De Jesús Sánchez M., and Elizondo S. 2006. Síndrome metabólico. *Revista de la facultad de medicina UNAM*. 49(3): 98-104

Chávez-Tapia N., Almeda P., Motola D., Sánchez K., y Méndez N. 2004. Síndrome metabólico, aspectos fisiopatológicos e importancia epidemiológica. *Médica sur*. 11 (3): 160-169

Consenso Mexicano de Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico.1999. *Revista mexicana de cardiología*. 1: 3-19.

Cordero A., Moreno J., Alegría E. 2005. Hipertensión arterial y síndrome metabólico. *Revista Española de Cardiología*. 5: 38D-45D.

Coronato S., Laguens G., and Di Gorolamo V. 2012. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina Buenos Aires*. (72): 495-502

Daragmeh J., Barriah W., Saad B., and Zaid H. 2016. Analysis of PI3K pathway components in human cancers. *Oncology letters*. (11)2913-2918

Díaz A., Limón D., Mendieta L., Chamorro G., et al. Amyloid- β ₂₅₋₃₅ impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neuroscience Research*. 63(2): 129-137

Díaz A., Limón D., et al. 2013. Estudio del proceso inflamatorio y neurodegenerativo sobre la memoria espacial de ratas con inyección del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la corteza temporal. Tesis Doctoral. FCQ-BUAP.

Duarte A., Moreira P., Oliveira C. 2012. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *Journal of Aging Research*. 21p

Ennaceur A., Cavoy A., and Kamel M. 1991. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs non spatial working memory. *Behavioral Brain research*.51: 83-92.

ENSANUT 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. <http://ensanut.insp.mx/>

Escartin C., and Rouach N. Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. 2013. *Frontiers in neuroenergetics*. 5 (4):1-5

Fernández A., Madrigal E., Bautista M., Esquivel J., Morales A., Esquivel C., et al. 2011. Inflammation, oxidative stress and obesity. *International journal of molecular sciences*. (12): 3117-3132.

- Freeman L.** Haley-Zitlin V, Stevens C, and Granholm A. 2011. Diet-induced effects on neuronal and glial elements in the middle-aged rat hippocampus. *Nutritional Neuroscience*. 14(1) 32-44
- García V.** 2015. Evaluación del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria que induce la inyección del A β ₁₋₄₂ en el hipocampo de ratas con síndrome metabólico. Tesis de Licenciatura. BUAP
- Granholm A.,** Moore A., Nelson M., et al. 2008. Effects of a Saturated Fat and High Cholesterol Diet on Memory and Hippocampal Morphology in the middle-aged rat. *Journal of Alzheimers Disease*. 14(2): 133-145
- Gerozissis K.** 2003. Brain Insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cellular and molecular neurobiology*. 23(1):1-25
- Goldberg A.** 2015. Dyslipidemia. Endocrine and Metabolic Disorders. *Merck manuals professional edition*. 1-13
- González-Flecha L.,** and Castello P. 2000. La glicosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al día internacional*. 3(2): 1-17
- González M.,** 2012. Síndrome metabólico, dieta y marcadores de inflamación. Tesis de Doctoral. Universitat de les Illes Balears.
- Guo S.** 2014. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models to disease mechanisms. *Journal of endocrinology*. 220(2):1-23
- Halliwell B.** 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*. 97: 1634-1658
- Hardy J.,** and Selkoe D. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimers disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. (297): 353-356
- Haas J.,** Storch-Hagenlocher B., Biessmann A., and Wildemann B. 2002. Inducible nitric oxide synthase and argininosuccinate syntase: co-induction in brain tissue of patients with Alzheimers dementia and following stimulation with β -amyloid 1-42 in vitro. *Neuroscience letters*. 322(5): 121-125
- Kaku K.** 2010. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and its treatment policy. *Journal of the Japan Medical Association*. 53 (1): 41-46.
- Kandel, E.** 2001. Principios de Neurociencia. Edit McGraw Hill. Pag: 20-21,1227-1236.

- Kassi E.**, Pervanidou P. Kaltsas G. y Chrousos G. 2011. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BioMed Central*. 9(48):1-13
- Kido Y.**, Nakae J., Accili D. 2001. The insulin receptor and its cellular targets. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 86 (3): 972-979.
- Kodl C.**, and Seaquist E. 2008. Cognitive Dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine reviews*.29(4):494-511
- Lazcano Z.**, Solis O., Bringas ME., Limón D., Díaz A., Espinosa B., et al. 2014. Unilateral injection of $A\beta_{25-35}$ in the hippocampus reduces the number of dendritic spines in hyperglycemic rats. *Synapse*. 68:585-594
- Lizarzaburu JC.** Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica.2013. *Anales de la facultad de medicina*. 74(4):315-320
- Limón D.** 2009. Efectos de la fracción 25-35 de la proteína amiloide-beta sobre: los niveles de óxido nítrico en SNC, las proteínas de choque térmico, los patrones de glicosilación y la memoria espacial en ratas. Tesis de maestría. IPN
- Manzano N.**, and Mas-Oliva J. 2006. Estrés oxidativo, péptido β -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gaceta médica mexicana*. 142 (3): 229-238
- Matos M.**, Augusto E,m Oliviera R., and Agostinho P. 2008. Amyloid beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitoge-activated protein kinase cascades. *Neuroscience*. (156): 898-910.
- Mattson M.** 2004. Phatways towards and away from Alzheimers disease. *Nature*. 430(7000): 631-639
- Mediavilla J.** Complicaciones de la Diabetes mellitus: diagnóstico y tratamiento. 2001. *Semergen*. 27: 132-145.
- Nalivaeva N.**, Belyaev N., Kerridge C., and Turner A. 2014. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer’s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 6 (235):1-13
- Olivares JA.**, and Arellano A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica*. 27(1):9-18.
- Pasinetti GM.**, and Eberstein JA. 2008. Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in alzheimer’s disease. *Journal of Neurochemistry*. 106 (4): 1503-1514.

- Parks J.**, Smith T., Trimmer P., Bennett J., and Parker Jr D. 2001. Neurotoxic A β peptides increase oxidative stress *in vivo* through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition *in vivo*. *Journal of neurochemistry*. (76): 1050-1056
- Patel H.**, and Patel V. 2015. Inflammation and metabolic syndrome: an overview. *Current Research in nutrition and Food Science*. 3(3):263-268.
- Paxinos G, Watson C.** 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, New York, NY
- Rask-Madsen C.**, and Kahn R. 2013. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. 32 (9): 2052-2059
- Ríos J.**, Cisternas P., Arrese M., Barja S., and Inestrosa N. 2014. Is Alzheimer’s disease related to metabolic syndrome? A wtn signaling conundrum. *Progress in neurobiology*. 121:125-146
- Scarpellini E.**, and Tack J. 2012. Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. *Digestive Diseases*. 30: 148-153
- Selkoe D.** 2001. Alzheimers disease: genes, proteins and therapy. *Physiological reviews*. 81 (2): 742-760
- Shan K.**, DeSilva S., and Abbruscato T. 2012. The role of glucose transporters in brain disease:diabetes and Alzheimer’s disease. *International journal of molecular sciences*. 13: 12629-12655
- Shi Du Y.**, Schmidt A., Anderson M., Zhang J., Brett J., et al. 1994. Enhanced celular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end productos with their receptors/binding proteins. *The journal of biological chemistry*. 269(13): 9889-9897
- Tarnikova O.**, Orlov M., and Bobkova N. 2015. Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, interaction and Prion-like properties. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*.55: 351-390.
- Treviño S.**, Aguilar P., Flores J., Brambila E., Díaz A., et al. A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*. 1-13
- Troncoso J.**, Kawas C., Pardo C., Aguilar F. 2006. Lesiones precoces en la enfermedad de Alzheimer. *Plasticidad y restauración neurológica*. 5(2):129-135

Van Dijk G., Van Heijningen S., Reijne A., et al. 2015. Integrative neurobiology of metabolic diseases, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*. 15.

Varman S., and Shulman G. 2012. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Revis Cell* 148: 852-871.

Vekrellis K., Ye Z., Qiao-Qiu W., Walsh D., et al. 2000. Neurons regulate extracellular levels of Amyloid B-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *The journal of neuroscience* 20 (5): 1657-1665.

Ventura A. 2004. Influencia de la diabetes en el deterioro cognitivo. Jornadas de fomento de la investigación. Universidad JAUME

Vlassara H., Striker J., Teichberg S., Fuh H., Ming Y., and Steffes M. 1994. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Medical Sciences*.(91): 11704-11708

Watts A., Loskutova N., et al. 2013. Metabolic Syndrome and Cognitive Decline in Early Alzheimer’s Disease and Healthy Older Adults. *Journal of Alzheimers Disease*. 35 (2): 253-265.

Wilcox G. 2005. Insulin and insulin Resistance. *Clinical Biochemical*. (26):19-39

