



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS



INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LABORATORIO DE NEUROPLASTICIDAD Y
METABOLISMO

**Evaluación del efecto del extracto de hojas de la
orquídea *Prosthechea karwinskii* (Lirio amarillo)
sobre la conducta y las regiones hipocampales en
un modelo animal de Diabetes tipo II.**

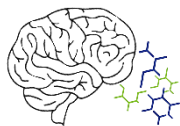
Tesis de para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA:

LBM. MAYTE LÓPEZ TEYSSIER

DIRECTOR

D. C. RUBÉN ANTONIO VÁZQUEZ ROQUE



LABORATORIO DE
NEUROPLASTICIDAD Y
METABOLISMO

ENERO, 2026

Agradecimientos

La culminación de este trabajo representa no solo el final de una etapa académica, sino el esfuerzo compartido de muchas personas que me acompañaron en el camino, por lo que quiero manifestar mi profunda gratitud a todas ellas.

- A mi director de tesis, el D.C. Rubén Antonio Vázquez Roque, por su apoyo, enseñanza y sobre todo paciencia durante la realización de este trabajo.
- A los doctores Alejandro C. Moyaho Martínez y Enrique Soto Eguibar, sus críticas constructivas han sido fundamentales para la realización de esta tesis.
- A mis padres por darme su amor y apoyo incondicional, espero que se sientan orgullosos y quiero que sepan que este logro también es suyo, gracias por creer en mí desde el primer día.
- A mi hermano, te quiero mucho y siempre podrás contar conmigo, gracias por compartir tantos momentos conmigo, te admiro y sé que eres un excelente hombre, hermano y nutriólogo clínico.
- A mi novio, gracias por todo tu amor, compromiso y apoyo incondicional durante este año, tu presencia en mi vida no solo me hace feliz, me hace crecer como persona, te amo y espero que nuestra historia esté llena de amor, paz y entendimiento.
- A Mayra, mi compañera en esta investigación, aprendí mucho de ti, académica y personalmente, gracias por tu amistad, sin duda repetiría “el bucle”.
- A Pablo Olivares, que en paz descanse, por su apoyo técnico para el desarrollo de esta tesis y por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera más amena.
- A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Miguel y Roberto, que además de ser excelentes biomédicos, me brindan su amistad y apoyo.
- A mis amigos, dentro y fuera de la maestría, gracias por su cariño incondicional.
- A mis gatitos Leah, Meimei y a mi perrita Jacob, porque con su ternura me han dado una inmensa felicidad y por acompañarme en las noches de desvelo.
- Por último, gracias a la niña Mayte de 10 años, que es mi ejemplo cuando pienso que las cosas son difíciles, recordando cuando un niño de su clase le dijo que los sueños no se cumplen y ella respondió “los míos sí”.

Contenido

1.	Resumen	1
2.	Índice de figuras	2
3.	Índice de tablas	3
4.	Abreviaturas	4
5.	Introducción	7
6.	Antecedentes	8
6.1.	Definición y clasificación de la Diabetes	8
6.2.	Diabetes tipo 2	9
6.2.1.	Cuadro clínico	10
6.2.2.	Diagnóstico	10
6.2.3.	Etiología y factores de riesgo	11
6.2.4.	Fisiopatología	11
6.2.5.	Hipocampo	12
6.2.6.	Tratamiento	15
6.2.6.1.	<i>Prosthechea karwinskii</i>	16
7.	Justificación	24
8.	Planteamiento de problema	25
9.	Hipótesis	26
10.	Objetivos	26
10.1.	Objetivo general	26
10.2.	Objetivos específicos	26
11.	Material y métodos	27
11.1.	Estrategia de trabajo	27
11.2.	Muestreo	28

11.2.1.	Definición de la unidad población.....	28
11.2.2.	Criterios de selección de las unidades de muestreo	28
11.2.2.1.	Criterios de inclusión.....	28
11.2.2.2.	Criterios de exclusión.....	29
11.2.3.	Tamaño de la muestra	29
11.2.4.	Definición de las variables y escalas de medición.....	29
11.3.	Método de recolección de datos.....	29
11.4.	Soluciones.....	30
11.5.	Modelo experimental	30
11.6.	Caracterización del modelo experimental.....	31
11.7.	Administración del extracto.....	33
11.8.	Segunda prueba de tolerancia a la glucosa	33
11.9.	Pruebas de conducta.....	34
11.9.1.	Campo abierto	34
11.9.2.	Prueba de reconocimiento de objeto (NORT)	34
11.9.3.	Laberinto elevado en cruz.....	36
11.10.	Extracción de tejidos	38
11.11.	Pruebas histológicas	39
11.11.1.	Protocolo de inmunofluorescencia.....	39
11.11.2.	Captura de las microfotografías.....	41
11.12.	Protocolos experimentales por objetivo	42
11.13.	Análisis de datos	43
11.14.	Diseño estadístico	44
11.14.1.	Hipótesis estadística	44
11.14.2.	Prueba estadística.....	45

12.	Resultados	46
12.1.	Curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento	46
12.2.	Parámetros morfométricos	49
12.2.1.	Aumento de peso	50
12.3.	Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento	52
12.4.	Prueba de Campo abierto	55
12.4.1.	Actividad motora	55
12.4.2.	Conductas relacionadas con la ansiedad/exploración	56
12.5.	Prueba de reconocimiento de objeto novedoso	57
12.6.	Laberinto elevado en cruz	60
12.7.	Densidad celular	61
12.8.	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	64
12.9.	Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	67
12.10.	Sinaptofisina (SYP)	72
12.11.	Perfil lipídico	74
13.	Discusión	77
13.1.	Caracterización del biomodelo y el efecto del tratamiento en el aumento de peso y tolerancia a la glucosa	77
13.2.	Efecto del tratamiento en la conducta	81
13.3.	Efecto del tratamiento en el hipocampo (número de células, BDNF, GFAP y SYP)	83
13.3.1.	Densidad celular	83
13.3.2.	Factor neurotrófico derivado del cerebro	84
13.3.3.	Astrocitos	86
13.3.4.	Sinaptofisina	87
13.4.	Efecto del tratamiento en el perfil lipídico	87

14.	Conclusiones	90
15.	Perspectivas	91
16.	Bibliografía	92
17.	Anexos	106
17.1.	Anexo 1. Determinación de ROIs	106
17.2.	Anexo 2. Microfotografías GFAP	109

1. Resumen

Antecedentes: La Diabetes tipo 2 (DT2) es el tipo de Diabetes más común en el humano y se caracteriza por presentar resistencia a la insulina e hiperglucemia, que conducen a estrés oxidativo e inflamación, lo que lleva al daño de diferentes regiones cerebrales, como el hipocampo, favoreciendo a la demencia y al deterioro cognitivo. En la medicina tradicional algunas plantas se han utilizado para el control de la DT2, entre ellas está la *Prosthechea karwinskii* (*P. karwinskii*), una orquídea endémica de México que, en ratas Wistar con síndrome metabólico, ha presentado efectos hipoglucemiantes, antioxidantes y antiinflamatorios.

Objetivo: Analizar el efecto del extracto de hojas de *P. karwinskii* sobre la actividad exploratoria, memoria y respuesta de ansiedad, así como cambios en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratas *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF).

Métodos: Se administró extracto de hojas de *P. karwinskii*, durante 4 semanas, a ratas de la cepa ZDF y se realizaron pruebas de conducta para evaluar actividad motora, cognición y ansiedad, además de pruebas histológicas para evaluar densidad celular, niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), sinaptofisina (SYP) y número de astrocitos reactivos, en CA1, CA3 y GD del hipocampo, así como determinación de parámetros morfométricos, glucosa y perfil lipídico.

Resultados: El extracto de hojas de *P. karwinskii* produjo la reducción del aumento de peso en ratas ZDF obesas normoglucémicas, disminución de glucosa, mejora de memoria, aumento en la densidad celular de GD, aumento de niveles de BDNF y disminución de astrocitos reactivos en ZDF obesas hiperglucémicas, así como la disminución de la dislipidemia en ratas ZDF obesas.

Conclusión: El extracto de hojas de *P. karwinskii* tuvo efecto antiobesidad, hipoglucemiante e hipolipemiante, lo que condujo a la mejora de la cognición, debido a sus efectos en el hipocampo donde produjo aumento celular, disminución de astrocitos reactivos y aumento de BDNF.

2. Índice de figuras

Figura 1. Mapa del número estimado de adultos (20 a 79 años) con Diabetes por país, 2024.	9
Figura 2. Circuito trisináptico del hipocampo	14
Figura 3. <i>Prosthechea karwinskii</i> y su hábitat.....	16
Figura 4. Diagrama de estrategia de trabajo.	28
Figura 5. Diagrama de prueba de tolerancia a la glucosa	32
Figura 6. Posibles ubicaciones de los objetos en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso.....	36
Figura 7. Conformación del laberinto elevado en cruz.....	37
Figura 8. Diagrama de procedimientos empleados para la extracción de tejidos.	39
Figura 9. Diagrama del protocolo empleado para las pruebas de inmunofluorescencia	40
Figura 10. Curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento.....	48
Figura 11. Peso por semana.	52
Figura 12. Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento.	54
Figura 13. Actividad motora.	56
Figura 14. Conductas relacionadas con la ansiedad.	57
Figura 15. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso.....	59
Figura 16. Prueba de laberinto elevado en cruz.	61
Figura 17. Densidad celular.	63
Figura 18. Imagen representativa de microfotografía con marca anti-BDNF	65
Figura 19. Expresión de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).....	66
Figura 20. Astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP	69
Figura 21. Imagen representativa de inmunofluorescencia para GFAP	70
Figura 22. Microfotografías de regiones hipocámpales CA1, CA3 y GD con marca anti-GFAP.	71
Figura 23. Imagen representativa de microfotografía con marcaje anti-SYP	72
Figura 24. Expresión de sinaptofisina (SYP).	73
Figura 25. Perfil lipídico.....	76

3. Índice de tablas

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de la Diabetes.....	10
Tabla 2. Compuestos detectados por UHPLC-ESI-qTOF-MS/MS en el extracto de hojas de <i>Prosthechea karwinskii</i>	23
Tabla 3. Anticuerpos utilizados y su concentración	41
Tabla 4. Características de la rata <i>Zucker Diabetic Fatty</i>	50

4. Abreviaturas

AGE. Productos finales de glicación avanzada

AMPA. Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

BSA. Albumina sérica bovina

CA. Cuerno de Amón

CAT. Catalasa

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

DT1. Diabetes tipo 1

DT2. Diabetes tipo 2

EE. Error estándar

GD. Giro dentado

GFAP. Proteína ácida fibrilar glial

GLUT. Transportador de glucosa

GP. Glucemia plasmática

GPA. Glucosa plasmática en ayunas

GPx. Glutación peroxidasa

GSH. Glutación

GSH-Px. Glutación peroxidasa

GT. Glutación reductasa

HDL-c. Colesterol de alta densidad

HG. Hiperglucémicas

HS-CRP. Proteína C-reactiva de alta sensibilidad

ITG. Intolerancia a la glucosa

IMC. Índice de masa corporal

IR. Índice de reconocimiento

LDL-c. Colesterol de baja densidad

LEAN. Ratas *ZDF* delgadas

LTP. Potenciación a largo plazo

MCP. Memoria a corto plazo

MLP. Memoria a largo plazo

NFκB. Factor de transcripción nuclear kappa B

NG. Normoglucémicas

NMDA. N-metil-D-aspartato

NORT. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

OZDF NG. Ratas *ZDF* obesas

P. karwinskii. Prosthechea karwinskii

PBS. Solución buffer de fosfatos

PFA. Paraformaldehído

PTG. Prueba de tolerancia oral a la glucosa

RAGE. Receptor de productos finales de glicación avanzada

ROS. Especies reactivas de oxígeno

SOD. Superóxido dismutasa

SYP. Sinaptofisina

TNF-α. Factor de necrosis tumoral alfa

TX. Tratamiento

UHPLC. Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento

VH. Control, vehículo

VLDL-c. Colesterol de muy baja densidad

ZDF. Zucker Diabetic Fatty

5. Introducción

La Diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad que presenta pérdida progresiva, no autoinmune, de la secreción adecuada de insulina por las células β pancreáticas y que se caracteriza por hiperglucemia (American Diabetes Association, 2026; World Health Organization, 2020). Esta enfermedad representa el 90% de la incidencia en Diabetes y, se ha convertido en un problema mundial al ser la segunda causa de muerte, con 589 millones de pacientes para el 2024 (American Diabetes Association, 2026; International Diabetes Federation, 2025; World Health Organization, 2020). En México, la Diabetes representa uno de los mayores problemas de salud pública, ubicándose en el número 8 de los países con más casos en el mundo, con 13.6 millones casos (International Diabetes Federation, 2025); adicionalmente para el primer trimestre de 2025 se ha reportado a Puebla como el tercer estado con más casos de Diabetes en el país (INEGI, 2025).

Con el descubrimiento sobre que la DT2 favorece la demencia y el deterioro cognitivo es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos que actúen sobre la hiperglucemia, el estrés oxidativo y la inflamación y que mejoren el estado cognitivo (Alkasabera et al., 2021; Yonamine et al., 2023).

Debido a esto se ha estudiado a la medicina tradicional, ya se utilizan plantas para tratar la DT2, por ejemplo la *Prosthechea karwinskii* (*P. karwinskii*), una orquídea endémica de la zona sur de México (Castillo-Pérez et al., 2019; Cruz-Garcia et al., 2014; Nongdam, 2014), que en ratas Wistar con síndrome metabólico ha disminuido los niveles de glucosa, el aumento de peso, los niveles de lípidos y la inflamación (Barragán-Zarate et al., 2021; Barragán-Zarate et al., 2024).

En los siguientes apartados de este trabajo se abordarán los temas relacionados con la *P. karwinskii*, la cognición y la Diabetes tipo 2, se exponen y analizan los resultados obtenidos y al final se describe el efecto de la administración del extracto de hojas de la *P. karwinskii* en ratas *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF), un modelo de Diabetes tipo 2.

6. Antecedentes

6.1. Definición y clasificación de la Diabetes

La Diabetes es una enfermedad caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa plasmática (hiperglucemia) y se puede clasificar en diferentes categorías generales de acuerdo con su fisiopatología (American Diabetes Association, 2026; World Health Organization, 2020):

- **Diabetes gestacional.** Se presenta como una hiperglucemia, con valores de glucosa en sangre superiores a los normales, pero por debajo de los umbrales de diagnóstico para la Diabetes, que se diagnostica en el segundo o tercer trimestre del embarazo y que no se manifiesta claramente antes de la gestación (American Diabetes Association, 2026; International Diabetes Federation, 2025; World Health Organization, 2020).

- **Tipos específicos de Diabetes debidos a otras causas.** Por ejemplo, síndromes de Diabetes monogénica como la Diabetes neonatal y la Diabetes al inicio de la madurez en los jóvenes; enfermedades del páncreas exocrino como la fibrosis quística y la pancreatitis; y las Diabetes inducidas por fármacos o sustancias químicas, por ejemplo, glucocorticoides, tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos (American Diabetes Association, 2026).

- **Diabetes tipo 1 (DT1).** Es la forma más común de Diabetes en niños y adolescentes en la mayoría de los países, se debe a que el páncreas no produce suficiente insulina como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, lo que lleva a que el cuerpo produzca poca o nula insulina (American Diabetes Association, 2026; International Diabetes Federation, 2025; World Health Organization, 2020).

- **Diabetes tipo 2 (DT2).** Se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre. Se debe a la pérdida progresiva, no autoinmune, de la secreción adecuada de insulina por las células β pancreáticas, frecuentemente en un contexto de resistencia a la insulina y síndrome metabólico (American Diabetes

Association, 2026; International Diabetes Federation, 2025; World Health Organization, 2020).

6.2. Diabetes tipo 2

La Diabetes tipo 2 (DT2) es el tipo de Diabetes más común en el humano, representando más del 90% de la incidencia de Diabetes a nivel mundial (American Diabetes Association, 2026; International Diabetes Federation, 2025; World Health Organization, 2020). Para el 2024, se estimaba que a nivel mundial existían alrededor de 589 millones de adultos (entre 20 y 79 años) con Diabetes, representando al 11.1% de la población mundial en este grupo de edad (International Diabetes Federation, 2025). En México, en 2024, se reportaron alrededor de 13.6 millones de casos de Diabetes, en adultos de 20 a 79 años, lo que corresponde al 16.4% de la población de nuestro país con esa edad. Por lo tanto, la Diabetes es una de las enfermedades más frecuentes en todo el mundo y nuestro país ocupa un lugar predominante en el mapa mundial de la Diabetes (Ver **Figura 1**) lo que genera graves desafíos sanitarios y económicos para la población global y mexicana.

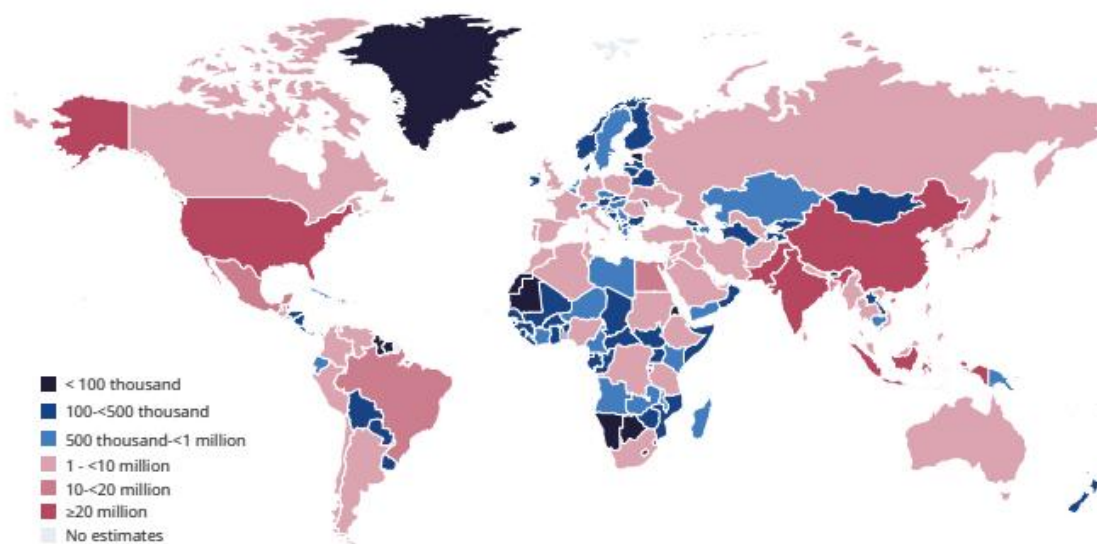


Figura 1. Mapa del número estimado de adultos (20 a 79 años) con Diabetes por país, 2024.
Imagen obtenida del Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de la Diabetes, 11ª edición (International Diabetes Federation, 2025).

6.2.1. Cuadro clínico

La Diabetes tipo 2 puede presentar una sintomatología similar a la de la Diabetes tipo 1, pero su inicio suele ser mucho menos drástico y, frecuentemente, completamente asintomático lo que dificulta o imposibilita determinar el momento exacto de aparición de la Diabetes tipo 2, retrasando su diagnóstico y teniendo la posibilidad de presentar complicaciones, de tal manera que muchos son diagnosticados porque ya presentan una o más de las complicaciones asociadas. Los síntomas característicos de hiperglucemia, que se presentan en la DT2, son poliuria (orina excesiva), polidipsia (sed excesiva), y polifagia (Hambre excesiva) (International Diabetes Federation, 2025; Secretaría de Salud, 2012).

6.2.2. Diagnóstico

La Diabetes se puede diagnosticar con base en los valores de hemoglobina glicosilada o en el nivel de glucosa en sangre, de esta manera, los criterios para el diagnóstico de Diabetes incluyen: la glucemia plasmática (GP) en ayunas, la GP a las 2 horas (durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa, PTG), o la glucemia aleatoria acompañada de síntomas clásicos de hiperglucemia (poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable) o crisis hiperglucémicas (American Diabetes Association, 2026; International Diabetes Federation, 2025; World Health Organization, 2020); los valores de diagnóstico de la Diabetes para cada criterio se encuentran en la **Tabla 1**.

Criterio	Características	Diagnóstico
Hemoglobina glicosilada	Puede ser inexacta en el caso de ciertas afecciones.	≥6,5% (48 mmol/L)
GP en ayunas.	Se define al ayuno como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 h.	≥126 mg/dL (≥7,0 mmol/L).
GP a las 2 h durante la PTG	75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.	≥200 mg/dL (≥11,1 mmol/L)
GP aleatoria	En personas con síntomas, en cualquier momento del día, independientemente del tiempo transcurrido desde última comida.	≥200 mg/dL (≥11,1 mmol/L).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de la Diabetes.

GP: glucosa plasmática; PTG: prueba de tolerancia a la glucosa. Fuentes: Organización Mundial de la Salud, Federación internacional de Diabetes y Asociación Americana de la Diabetes (American Diabetes Association, 2026; International Diabetes Federation, 2025; World Health Organization, 2020).

6.2.3. Etiología y factores de riesgo

En la DT2 la incapacidad de las células para responder adecuadamente a la insulina se denomina resistencia a la insulina, esta provoca un aumento en la producción de insulina que, con el paso del tiempo puede resultar en una producción inadecuada de la misma, lo que conduce a la hiperglucemia que caracteriza a esta patología (International Diabetes Federation, 2025).

Aún no se comprenden completamente las causas de la DT2 (International Diabetes Federation, 2025), sin embargo, se ha establecido que la predisposición genética es una parte importante en la susceptibilidad a la DT2, y que una dieta poco saludable, así como un estilo de vida sedentario, son grandes impulsores para el desarrollo de esta enfermedad (Zheng et al., 2018), identificando al sobrepeso y la obesidad como sus factores de riesgo (International Diabetes Federation, 2025; Malone & Hansen, 2019; Zheng et al., 2018).

Se ha documentado que la prevalencia de DT2 está aumentando en paralelo con la creciente incidencia de obesidad (Zheng et al., 2018), de esta manera el exceso de adiposidad (evaluado con un índice de masa corporal alto) es el factor de riesgo más importante para la DT2, ya que está asociado a irregularidades metabólicas que llevan a la resistencia a la insulina, lo que a su vez provoca que los niveles de glucosa en sangre permanezcan elevados (hiperglucemia) (Nowotny et al., 2015; Zheng et al., 2018).

6.2.4. Fisiopatología

Se ha propuesto a la hiperglucemia como un factor importante que contribuye a las complicaciones de la Diabetes, debido a que lleva a la generación de productos finales de glicación avanzada (AGE) que se unen al receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) aumentando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que activa el factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB), aumentando la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleucina 6 (Nowotny et al., 2015), aunque la relevancia de las interacciones AGE-RAGE, aún

está en discusión (Nowotny et al., 2015), en otros artículos ya se ha reportado que el estrés oxidativo y la inflamación están asociados a la Diabetes.

El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio bioquímico entre un exceso en la producción de ROS (que son productos normales del metabolismo) y la deficiencia de mecanismos antioxidantes, entre los que se pueden resaltar a las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GT) y catalasa (CAT) (Hajam et al., 2022; Lizardo et al., 2017). Se ha caracterizado que durante la DT2 existe la presencia de estrés oxidativo con una alteración en las actividades de las enzimas antioxidantes (Kumawat et al., 2013; Singh et al., 2022), de igual forma, se ha propuesto que el estrés oxidativo puede mediar la disfunción cerebral en la Diabetes, ya que el cerebro tiene una gran vulnerabilidad al daño oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno, su abundante contenido de lípidos y su relativa escasez de enzimas antioxidantes en comparación con otros tejidos (Muriach et al., 2014), así, se ha asociado a la hiperglucemia crónica con el daño oxidativo de diferentes regiones cerebrales, por ejemplo del hipocampo (McNeilly et al., 2023).

En adición, recientemente, la señalización de la insulina dentro del cerebro ha pasado de ser descrita como inexistente a ser reconocida como elemento clave de los procesos de memoria del hipocampo; de esta manera, se ha propuesto que la resistencia a la insulina central (en el cerebro) perjudica al metabolismo del hipocampo, debido a la desregulación del transportador de glucosa sensible a la insulina GLUT4 (McNay & Pearson-Leary, 2020), presentando al hipocampo como un elemento central en el deterioro cognitivo observado en la DT2 (Alkasabera et al., 2021; McNay & Pearson-Leary, 2020).

6.2.5. Hipocampo

El hipocampo es parte del sistema límbico, está situado en el lóbulo temporal, y consta de tres subregiones distintas: el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho (Cuerno de Amón, CA1-CA3) y el subículo (Beyaz, 2025; Chauhan et al., 2021; Xiong et al., 2017).

Las conexiones dentro del hipocampo son en gran parte unidireccionales y forman bucles cerrados que se originan principalmente en la corteza entorrinal adyacente. Por lo tanto, el flujo de información a través del hipocampo procede del giro dentado a CA3, a CA1 y al subículo, formando el circuito trisináptico principal (Beyaz, 2025; Chauhan et al., 2021; Xiong et al., 2017).

Así, la memoria se ve facilitada por la activación unidireccional de la conexión sináptica en el siguiente orden 1) Activación de la corteza entorrinal (por neocórtex y el sistema límbico); 2) los estímulos pasan, a través de la vía perforante, desde la corteza entorrinal al giro dentado (células granulares) que transmite hacia CA3 3) Las colaterales de Schaffer de CA3 (neuronas piramidales) transfieren estímulos a CA1; luego CA1 (neuronas piramidales) hace sinapsis en el subículo y se proyecta nuevamente hacia la corteza entorrinal (EC), como se puede ver en la **Figura 2** (Bin Ibrahim et al., 2022; Chauhan et al., 2021; Shi et al., 2023). Se propone que el mecanismo de almacenamiento de memoria incluye a la potenciación de largo plazo (LTP), la cual es una facilitación estable de los potenciales sinápticos tras la actividad sináptica de alta frecuencia, que es muy prominente en el hipocampo (Bin Ibrahim et al., 2022; Lynch et al., 1990). La LTP se produce una vez que la entrada de sodio, a través de la apertura del receptor AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), despolariza la terminal postsináptica lo suficiente como para eliminar el bloqueo de magnesio, lo que permite el reclutamiento de los receptores NMDA (*N-metil-D-aspartato*) que permiten la entrada de iones de calcio, el cual es un mensajero secundario que puede inducir cambios que conducen a la activación de cascadas de señalización intracelular y a la inducción de potenciación a largo plazo (LTP), mejorando la respuesta postsináptica (Bin Ibrahim et al., 2022; Lüscher & Malenka, 2012). De esta manera se reporta que el deterioro del hipocampo subyace al declive cognitivo observado en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Terreros-Roncal et al., 2021).

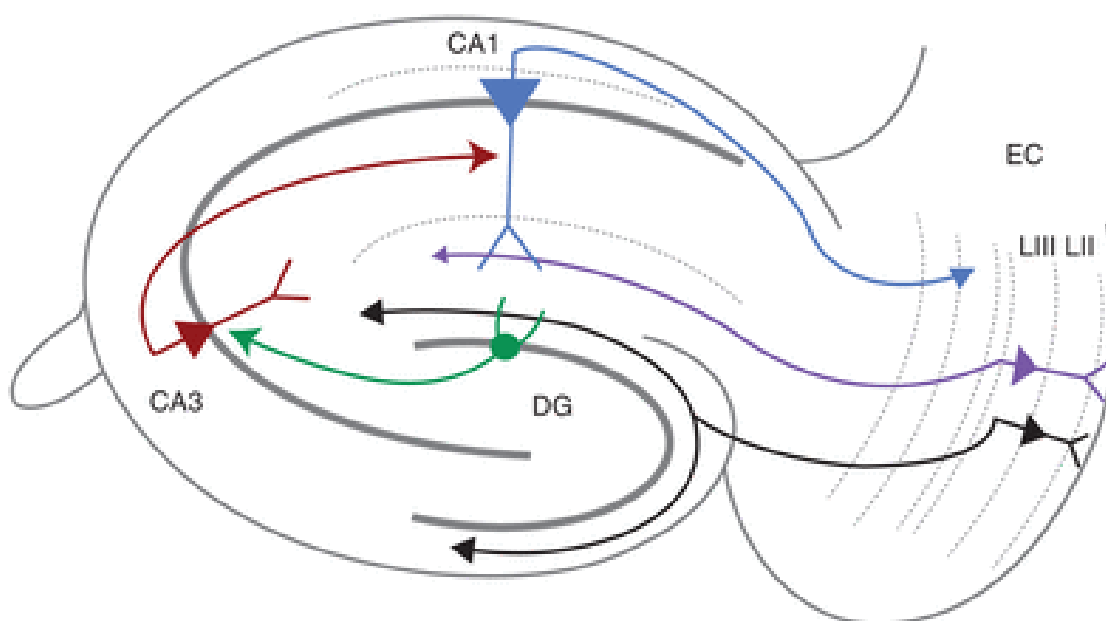


Figura 2. Circuito trisináptico del hipocampo

En este circuito, las células estrelladas de las capas superficiales (LII) de la corteza entorrinal (EC) envían proyecciones (negro) a las células granulares del Giro Dentado (GD) cuyas proyecciones de fibras musgosas (verde) excitan a las neuronas piramidales CA3 (Cuerno de Amón), que a su vez excitan a las células piramidales CA1 a través de la vía colateral de Schaffer (rojo), que proyecta axones hacia la corteza entorrinal (azul). Además de la vía trisináptica, las neuronas piramidales CA1 también reciben una proyección glutamatérgica directa de las neuronas piramidales EC LIII (morado) (Basu & Siegelbaum, 2015).

En la diabetes el hipocampo se ve afectado debido a que la hiperglucemia induce resistencia celular a la insulina, estrés oxidativo e inflamatorio, disfunción mitocondrial y aumento de la producción de AGE (Gupta et al., 2023), estos procesos llevan diferentes alteraciones celulares, por ejemplo se ha reportado, tras evaluar sus volúmenes hipocampales, la atrofia del hipocampo en pacientes diabéticos (Milne et al., 2018), además también se ha descrito que BDNF se encuentra disminuido en pacientes con diabetes y que cuanto más tiempo estén expuestos los pacientes a niveles de glucosa elevados y cuanto más grave sea su condición, menor será el nivel BDNF (Moosaie et al., 2023), así mismo se ha evidenciado astrogliosis reactiva en pacientes con diabetes (Llorián-Salvador et al., 2024), en conjunto, estas alteraciones conducen a la neurodegeneración y la demencia.

Con el descubrimiento sobre que la DT2 favorece la demencia y el deterioro cognitivo, se ha estudiado si la medicación antidiabética tiene algún efecto sobre el estado cognitivo (Alkasabera et al., 2021; Yonamine et al., 2023).

6.2.6. Tratamiento

Actualmente el tratamiento inicial contra la Diabetes consiste en cambiar el estilo de vida para controlar los niveles de glucosa en sangre, si esto no funciona, generalmente se inicia el tratamiento con Metformina, siendo este el medicamento de primera línea (International Diabetes Federation, 2025), a pesar de que se ha observado que este medicamento minimiza el deterioro cognitivo leve y modula varios cambios relacionados con la edad en el hipocampo (Alkasabera et al., 2021; Madhu et al., 2022), aún es necesario dilucidar las diferencias específicas de sexo, aclarar los posibles efectos secundarios a su ingesta, así como identificar la dosis necesaria para mejorar la función cognitiva en la DT2 (Madhu et al., 2022). Además de la metformina, el tratamiento de la DT2 a menudo requiere de inyecciones de insulina para controlar la hiperglucemia, cuya falta de manejo suele requerir un aumento progresivo de la dosis (International Diabetes Federation, 2025), por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos para la DT2 que actúen sobre diferentes puntos clave de la enfermedad, antes mencionados, como el sobrepeso u obesidad, la hiperglucemia, el estrés oxidativo y la inflamación.

La medicina tradicional puede ser un buen punto de partida, ya que las plantas con potencial terapéutico conocido y sospechado se han utilizado desde hace mucho tiempo en la medicina alternativa y complementaria, además existen diferentes plantas que se han reportado con actividad biológica sobre el metabolismo, entre ellas están las especies de la familia Orchidaceae (Okoduwa et al., 2017; Rojas-Olivos et al., 2017). En México existen muchas orquídeas endémicas y algunas de ellas han sido utilizadas como medicina herbaria, principalmente en el sistema de medicina indígena, para tratar diversas enfermedades, incluida la Diabetes, ya que tienen propiedades terapéuticas debido a su gran contenido de alcaloides, glicéridos y fitoquímicos; entre ellas se encuentra

la orquídea *Prosthechea karwinskii* (Castillo-Pérez et al., 2019; Cruz-Garcia et al., 2014; Nongdam, 2014).

6.2.6.1. *Prosthechea karwinskii*

La *Prosthechea karwinskii* (*P. karwinskii*), una es una orquídea endémica del oeste y sur de México, que tiene 3 nombre comunes: Itandeca amarilla, Lirio Amarillo y Monja amarilla; y que habita regiones montañosas donde crece como epífita (crece sobre otra planta sin parasitarla) colgante en bosques de encino (**Figura 3**) (Castillo-Pérez et al., 2024; Santos-Escamilla et al., 2024). En Oaxaca, esta orquídea se utiliza tradicionalmente con fines religiosos durante las celebraciones de Semana Santa y tiene aplicaciones en la medicina tradicional (Barragán-Zarate et al., 2024; Barragan-Zarate et al., 2022; Barragán-Zarate et al., 2025; Castillo-Pérez et al., 2024; Santos-Escamilla et al., 2024).



Figura 3. *Prosthechea karwinskii* y su hábitat.

A) Hábitat de *Prosthechea karwinskii*, un bosque de encino en San Pedro y San Pablo Teposcolula, Oaxaca. B) *Prosthechea karwinskii* crece in situ como epífita colgante en *Quercus* sp. en Santo Domingo Yanhuatlán,

A partir del 2014, se ha documentado el uso, en la medicina tradicional, de la orquídea *Prosthechea karwinskii* (*P. karwinskii*), informando que las partes de la planta empleadas como remedios son: sus pseudobulbos (tallos modificados que permiten el almacenamiento de agua y nutrientes en las orquídeas epífitas) para tratar la tos (en infusiones), curación de heridas y quemaduras (como cataplasma) y para tratar la Diabetes (en infusiones); sus flores que se utilizan, en infusión, para prevenir abortos espontáneos, ayudar en el parto y calmar la tos; y sus hojas para el control de la Diabetes (en infusiones o masticando las hojas) (Cruz-García et al., 2014).

A pesar de que tanto los pseudobulbos como las hojas se han empleados en la medicina tradicional para el tratamiento para la Diabetes, los estudios experimentales, han determinado que los extractos, de cada parte de la planta, tienen efectos diferentes sobre los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la DT2 que se menciona a continuación.

Rojas y colaboradores en 2017 reportaron que, en ratas Wistar con de síndrome metabólico inducido por sacarosa, el extracto de los pseudobulbos, así como el extracto de las hojas de *P. karwinskii*, disminuyen el tejido adiposo total (Rojas-Olivos et al., 2017), así mismo, Barragán y colaboradores en 2021 observaron, en el mismo modelo, que la administración oral de extracto de hojas de *P. karwinskii* a una dosis de 300 mg/kg presentó efecto antiobesidad, al reducir los depósitos de grasa abdominal y de grasa pericárdica (Barragán-Zarate et al., 2021). Una explicación a estos efectos es que el extracto de hojas de *P. karwinskii* contiene compuestos fenólicos que pueden inhibir el crecimiento del tejido adiposo debido a su actividad antiangiogénica y su capacidad para regular el metabolismo de los adipocitos (Rojas-Olivos et al., 2017).

Rojas y colaboradores, en el mismo trabajo, también reportan que los extractos de pseudobulbos y hojas disminuyen los niveles de glucosa, teniendo un mayor efecto hipoglucemiante el extracto de las hojas (Rojas-Olivos et al., 2017),

mientras que Barragán y colaboradores informan que el extracto de hojas de *P. karwinskii* (300 mg/kg) reduce los niveles de glucosa y triglicéridos, no afecta los niveles de insulina y que disminuye la resistencia a la insulina (Barragán-Zarate et al., 2021; Barragán-Zarate et al., 2024). Este efecto anti hiperglucemiante del extracto de hoja de *P. karwinskii* podría atribuirse a su mayor capacidad antioxidante (Rojas-Olivos et al., 2017), ya que con la identificación de sus compuestos bioactivos se ha descrito que contiene embelina, la cual aumenta la actividad de enzimas antioxidantes, además también contiene ácido clorogénico, que mejora la absorción de glucosa por parte de los músculos esqueléticos, rutina que disminuye la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, aumenta la absorción tisular de glucosa y estimula la secreción de insulina, y floridzina que, reduce los niveles de glucosa (Barragan-Zarate et al., 2022).

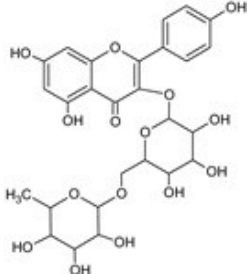
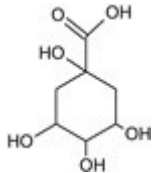
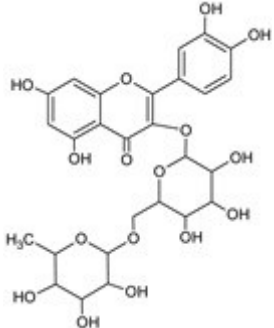
Rojas y colaboradores también exponen que los extractos de *P. karwinskii* disminuyen los niveles de colesterol y triglicéridos (Rojas-Olivos et al., 2017), del mismo modo que, Barragán y colaboradores reporta que el extracto de hojas de *P. karwinskii* tiene un efecto hipotrigliceridémico, regresando los niveles de triglicérido a niveles similares a los normales, y que la aplicación del extracto de hojas a una dosis de 100 mg/kg fue la que provoco una mayor disminución del colesterol total (Barragán-Zarate et al., 2021).

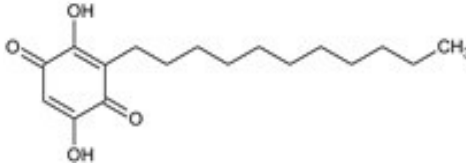
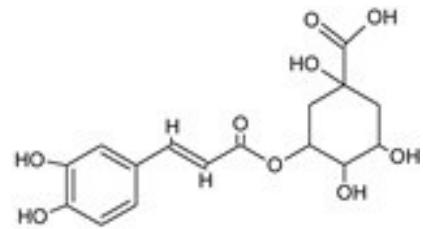
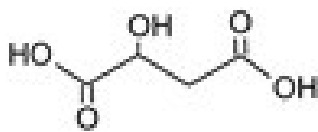
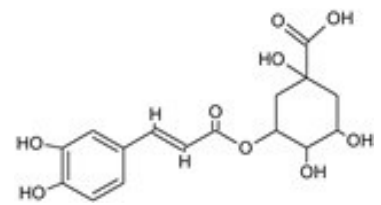
Los extractos de *P. karwinskii* también presentan capacidad antioxidante, tanto el extracto de hojas como el de pseudobulbos de *P. karwinskii* lograron inhibir la producción de ROS, teniendo la mayor capacidad antioxidante el extracto de las hojas (Barragan-Zarate et al., 2022; Rojas-Olivos et al., 2017) Los compuestos antioxidantes identificados en *P. karwinskii* son rutina, kaempferol-3-O-rutinósido, embelina y guanosina; estos compuestos logran disminuir el estrés oxidativo mediante el aumento de la actividad antioxidante de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glutatión (GSH) (Barragan-Zarate et al., 2022).

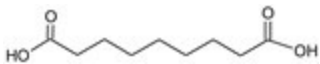
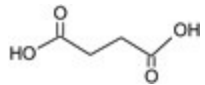
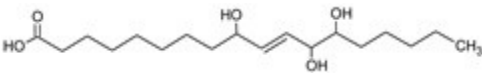
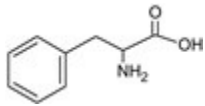
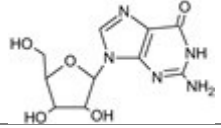
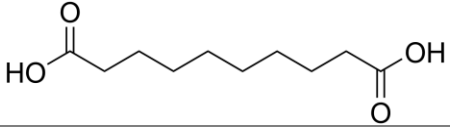
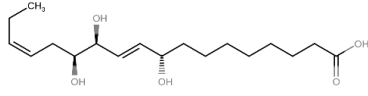
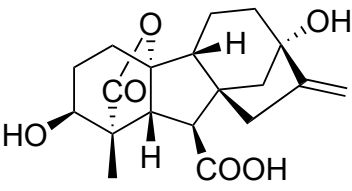
En adición el extracto de *P. karwinskii* también tiene un efecto antiinflamatorio, reportando resultados en los que el tratamiento con extracto de

hojas de *P. karwinskii* disminuye los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la proteína C-reactiva de alta sensibilidad (HS-CRP) a niveles similares a los normales, mientras que, aumenta los niveles de adiponectina a niveles similares a los normales (Barragán-Zarate et al., 2021).

En la **Tabla 2** se presentan los compuestos encontrados por Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento (UHPLC-ESI-qTOF-MS/MS) en el extracto de hojas de *P. karwinskii* (Barragán-Zarate et al., 2024; Barragán-Zarate et al., 2025).

Compuesto (Fórmula química)	Abundancia relativa (%)	Características clave para esta investigación	Estructura química
Kaempferol-3-O- rutinósido (C₂₇ H₃₀ O₁₅)	25.3	Se puede absorber en el intestino, tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Puede tratar la inflamación neuronal al inhibir la activación del factor de transcripción factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Ma et al., 2017).	
Ácido quínico (C₇ H₁₂ O₆)	22.21	Suprimió la expresión de mediadores proinflamatorios y el marcador de estrés oxidativo en el hipocampo inyectado con lipopolisacárido (Park et al., 2024). Promoción de la secreción de insulina y a una mejor tolerancia a la glucosa (Heikkilä et al., 2019).	
Rutina (C₂₇ H₃₀ O₁₆)	15.52	Disminuye la formación de ROS, precursores de AGE, citocinas inflamatorias y la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, aumenta de la captación tisular de glucosa (Ghorbani, 2017). Rutina protegió la pérdida neuronal hipocampal inducida por estrés crónico impredecible (Parashar et al., 2017) En un modelo murino de tauopatía, suprimió la gliosis y la neuroinflamación mediante la regulación negativa de la vía NF- κ B (Sun et al., 2021).	

Embelina		Puede atravesar la BHE (Bhuvanendran et al., 2019). Aumentó los niveles de BDNF en tejido hipocampal, aumentó el índice de reconocimiento visual, mejoró la neurogénesis en una condición similar a la enfermedad de Alzheimer inducida por escopolamina en un modelo de rata (Bhuvanendran et al., 2018). Inhibe la adipogénesis y la lipogénesis, además reduce niveles de triglicéridos, glucosa, colesterol total (Gao et al., 2017).	
(C₁₇ H₂₆ O₄)	8.6		
Ácido clorogénico		Mejoró la disfunción de la memoria al atenuar el estrés oxidativo del lóbulo frontal en un modelo de diabetes con estreptozotocina (Saputri et al., 2024). La administración de ácido clorogénico en pacientes con ITG disminuyó GPA y secreción de insulina, mientras que aumentó la sensibilidad a la insulina y mejoró el perfil lipídico (Zuñiga et al., 2018).	
(C₁₆ H₁₈ O₉)	8.44		
Ácido málico		El ácido málico mejoró los síntomas relacionados con el estrés e inhibió el anión superóxido y la neuroinflamación en el hipotálamo de ratas estresadas (Koriem & Tharwat, 2023).	
(C₄ H₆ O₅)	5.71		
Ácido neoclorogénico		Disminuyó el estrés oxidativo y mejoró la función de la BHE en un modelo de enfermedad de Alzheimer del pez cebra (Gao et al., 2025).	
(C₁₆ H₁₈ O₉)	4.35		

Compuesto (Fórmula química)	Abundancia relativa (%)	Estructura química
Ácido azelaico (C ₉ H ₁₆ O ₄)	2.1	
Ácido succínico (C ₄ H ₆ O ₄)	1.89	
Ácido pinélico (C ₁₈ H ₃₄ O ₅)	1.09	
L- (-)-Fenilalanina (C ₉ H ₁₁ NO ₂)	0,53	
Guanosina (C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅)	0,46	
Ácido sebácico (C ₁₀ H ₁₈ O ₄)	-	
Ácido 9, 12, 13- trihidroxi-10(E), 15(Z)octadecadienoico (C ₁₈ H ₃₂ O ₅)	-	
Giberelina A7 (C ₁₉ H ₂₂ O ₅)	-	

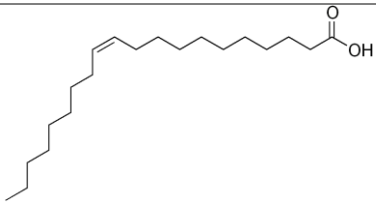
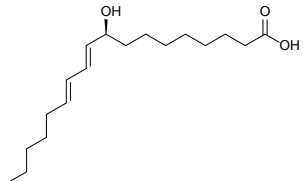
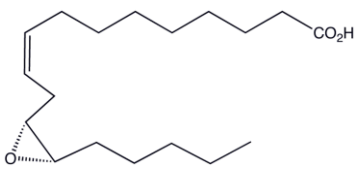
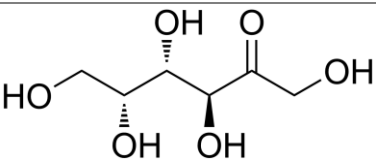
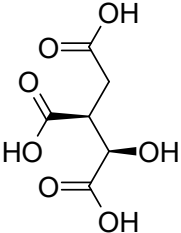
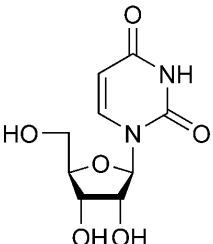
Ácido eicosenoico	-	
(C ₂₀ H ₃₈ O ₂)		
Ácido 9-hidroperoxi-10E, 12Z-octadecadienoico	-	
Ácido 12, 13-epoxi-9Z-octadecenoico	-	
(C ₁₈ H ₃₂ O ₃)		
D-tagatosa	-	
(C ₆ H ₁₂ O ₆)		
Ácido isocítrico	-	
(C ₆ H ₈ O ₇)		
Uridina	-	
(C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆)		

Tabla 2. Compuestos detectados por UHPLC-ESI-qTOF-MS/MS en el extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii*

Se observan los compuestos detectados en el extracto de hojas de *P. karwinskii*, así como su abundancia relativa y su estructura química (Barragán-Zarate et al., 2024; Barragán-Zarate et al., 2025), adicionalmente se observan las características deseables que tienen los compuestos más abundantes de este extracto para el tratamiento de la diabetes y su posible efecto en neurodegeneración. ITG, intolerancia a la glucosa; GPA, glucosa plasmática en ayuno; BHE, barrera hematoencefálica; ROS, especies reactivas de oxígeno; AGE, productos finales de glicación avanzada; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro.

7. Justificación

La Diabetes es una de las emergencias sanitarias mundiales de más rápido crecimiento de este siglo, en el 2024, había 589 millones de adultos, que vivían con Diabetes en todo el mundo, teniendo una prevalencia global del 11.1% en este grupo de edad (International Diabetes Federation, 2025). México se encuentra en el top 10 de los países con mayor número de casos de Diabetes en 2024, posicionándose en el puesto 8, con 13.6 millones de pacientes adultos (International Diabetes Federation, 2025); además, para el 2024 se reportó a la Diabetes como la segunda causa de defunciones en México, solo superada por las enfermedades del corazón, y con 112,641 defunciones por Diabetes, equivalentes al 13.8% de los fallecimientos totales reportados (INEGI, 2025). La calidad de vida de los pacientes con Diabetes está comprometida por complicaciones relacionadas con esta enfermedad, entre ellas complicaciones cardiovasculares, y complicaciones agudas, como cetoacidosis diabética, el estado hiperosmolar hiperglucémico, la acidosis láctica y la hipoglucemia; que a pesar de ser prevenibles, representan una alta morbilidad y mortalidad entre las personas con Diabetes (Harding et al., 2019). Además, se ha vinculado a la Diabetes con la disfunción cognitiva y con un aumento del riesgo de demencia (Biessels & Despa, 2018; Koekkoek et al., 2015; Liu et al., 2019), este efecto sobre la cognición se ha asociado con el daño oxidativo y la resistencia a la insulina en el hipocampo (Alkasabera et al., 2021; McNay & Pearson-Leary, 2020; McNeilly et al., 2023; Muriach et al., 2014), que son consecuencia de la obesidad, hiperglucemia, disminución de enzimas antioxidantes y procesos inflamatorios presentes en la DT2. El tratamiento de primera línea para estos pacientes es la metformina, pero en muchas ocasiones esta se debe acompañar de inyecciones de insulina para poder disminuir los niveles de glucosa en sangre (International Diabetes Federation, 2025), además aún no está claro el efecto que podría tener la metformina en la cognición (Madhu et al., 2022), por lo cual es necesario proponer otras alternativas para el tratamiento de DT2. En medicina tradicional *P. karwinskii* es usada como tratamiento de la DT2 (Cruz-Garcia et al., 2014), y además, el desarrollo de proyectos experimentales con esta

orquídea ha presentado pruebas de que el extracto de hojas de *P. karwinskii* tiene efecto antiobesidad, hipoglucemiante, antioxidante y antiinflamatorio (Barragán-Zarate et al., 2021; Barragan-Zarate et al., 2022; Rojas-Olivos et al., 2017), por lo que estudiar el efecto del extracto de hojas de *P. karwinskii* en la DT2 puede contribuir a encontrar nuevos tratamientos más eficaces.

8. Planteamiento de problema

El incremento en la incidencia de Diabetes ha ocasionado el aumento del gasto sanitario mundial pasando de 232,000 millones de dólares en 2007 a más de un billón (1'015,000'000,000) de dólares en 2024 (International Diabetes Federation, 2025). A pesar de la inmensa carga económica los tratamientos usados actualmente, como la metformina y la insulina, llegan a ser insuficientes y generalmente los pacientes presentan complicaciones que comprometen su calidad de vida, incluyendo la afectación de su cognición. Aunque en medicina tradicional se ha comprobado la utilidad de diversas plantas, como la *Prosthechea karwinskii* para el tratamiento de la Diabetes, la mayoría no se han estudiado en un entorno científico, y aunque se han descrito las diferentes vías por las cuales la Diabetes causa este deterioro cognitivo, resaltando a la inflamación y estrés oxidativo como elementos clave, no se ha utilizado a la *Prosthechea karwinskii* como base para la búsqueda de nuevos tratamiento que se enfoquen en dichos elementos. Por lo que se ha generado la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los efectos de la administración del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre la actividad exploratoria, la memoria y la respuesta de ansiedad, así como los cambios en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del hipocampo, y sobre los niveles de glucosa y lípidos de ratas *Zucker Diabetic Fatty*?

9. Hipótesis

El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* tiene efectos positivos sobre la actividad exploratoria, la memoria y la respuesta de ansiedad, así como en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del hipocampo, y sobre los niveles de glucosa y lípidos de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.

10. Objetivos

10.1. Objetivo general

Analizar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre la actividad exploratoria, la memoria y la respuesta de ansiedad, así como los cambios en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del hipocampo, y sobre los niveles de glucosa y lípidos en la cepa *Zucker Diabetic Fatty*.

10.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre los niveles de glucemia de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.
- 2) Determinar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre el perfil lipídico de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.
- 3) Evaluar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre las siguientes conductas en ratas *Zucker Diabetic Fatty*.
 - a) Actividad Exploratoria
 - b) Memoria de corto y largo plazo
 - c) Ansiedad
- 4) Cuantificar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre la densidad celular en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.

- 5) Determinar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre la expresión de BDNF en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.
- 6) Evaluar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre el número de astrocitos GFAP positivos en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.
- 7) Determinar el efecto del extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* sobre los niveles de SYP en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.

11. Material y métodos

11.1. Estrategia de trabajo

La estrategia de trabajo se dividió en los siguientes bloques:

- Primera prueba de tolerancia a la glucosa
- Administración del tratamiento
- Segunda prueba de tolerancia a la glucosa
- Pruebas de conducta, extracción de tejidos
- Extracción y preparación de tejidos
- Técnicas histológicas
- Captura de microfotografías
- El análisis de los datos

En la siguiente figura (**Figura 4**) se muestra cuál fue la estrategia de trabajo para lograr los objetivos de este proyecto.



Figura 4. Diagrama de estrategia de trabajo.

La estrategia de trabajo se dividió en 6 bloques: primera prueba de tolerancia a la glucosa, administración del tratamiento, segunda prueba de tolerancia a la glucosa, pruebas de conducta, extracción de tejidos, técnicas histológicas, captura de microfotografías y el análisis de los datos. Cada uno se explicará en las secciones correspondientes de material y métodos.

11.2. Muestreo

11.2.1. Definición de la unidad población

Para el siguiente proyecto se emplearon ratas de la cepa *Zucker Diabetic Fatty* adquiridas del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Dichas ratas fueron parte del proyecto: 100332977-UALVIEP-24/1.

11.2.2. Criterios de selección de las unidades de muestreo

11.2.2.1. Criterios de inclusión

Fueron elegibles ratas macho de la cepa *Zucker Diabetic Fatty* de entre 12 y 13 semanas de edad.

Se utilizaron cortes histológicos de regiones del Hipocampo Dorsal que se encuentren intactos después de su manipulación.

11.2.2.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron cortes histológicos que durante su manipulación fueron dañados.

11.2.3. Tamaño de la muestra

Las pruebas de comportamiento se realizaron en al menos 5 ratas por cada grupo de estudio.

Las pruebas histológicas se realizaron en al menos 4 ratas por cada grupo de estudio.

11.2.4. Definición de las variables y escalas de medición

Variable dependiente: Niveles de glucemia y lípidos, actividad exploratoria, la memoria, la respuesta de ansiedad, densidad celular, número de astrocitos reactivos, así como cantidad de marcaje por rodamina, correspondiente a la expresión de BDNF y sinaptofisina, en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del hipocampo en la cepa *Zucker Diabetic Fatty*.

Variable independiente: extracto de la *Prosthechea karwinskii*.

11.3. Método de recolección de datos

Los parámetros morfométricos se obtuvieron utilizando una cinta métrica y una báscula, los resultados se almacenaron en hojas de cálculo y posteriormente se analizaron y graficaron en GraphPad Prism.

Los niveles de glucosa en sangre, durante la prueba de tolerancia a la glucosa, se obtuvieron utilizando un glucómetro (CONTOUR®PLUS), los resultados se almacenaron en hojas de cálculo y finalmente se analizaron y graficaron en GraphPad Prism.

Los datos de las pruebas de conducta fueron obtenidos mediante el análisis, manual y con el software ANY-maze, de los vídeos obtenidos durante las pruebas de comportamiento, estos datos fueron comparados y graficados mediante el uso de GraphPad Prism.

Posterior a la realización del protocolo de inmunofluorescencia correspondiente, se capturaron imágenes de las zonas de interés, mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800 del laboratorio de microscopía del Instituto de Fisiología; posteriormente se realizó el análisis de imágenes correspondiente a cada protocolo con ayuda del programa *ImageJ Fiji*, los datos obtenidos fueron comparados y graficados mediante el uso de GraphPad Prism.

El perfil lipídico se obtuvo siguiendo los protocolos de SPINREACT® y utilizando un espectrofotómetro, arrojando resultados de absorbancia que después fueron procesados según las indicaciones de SPINREACT® para determinar las concentraciones de cada resultado, los datos obtenidos se compraron y graficaron con ayuda de GraphPad Prism.

11.4. Soluciones

- **Solución buffer de fosfatos (PBS) 1X.** Tenía la siguiente composición (en mM): 138 NaCl, 3 KCl, 8.1 Na₂HPO₄, 1.5 KH₂PO₄.
- **Paraformaldehído (PFA) 4%:** A un litro de PBS se le añadió 40 gr de PFA.
- **Buffer de citratos:** 80% de citrato de sodio 0.1 M y 20% de ácido cítrico 0.1M.
- **Albumina sérica bovina (BSA) al 2%:** A 1 ml de PBS se le agregaba 0.02 gr de BSA.
- **Tritón X-100 al 0.2%:** A 50 ml de PBS se le añadió 0.1 ml de Tritón X-100.

11.5. Modelo experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Zucker Diabetic Fatty (ZDF)*, un modelo experimental para la Diabetes tipo 2 (DT2), que presenta dos fenotipos: el fenotipo obeso (OZDF), correspondiente a ratas macho que son homocigotas recesivas (fa/fa) que tienen receptores de leptina no funcionales y desarrollan hiperlipidemia,

obesidad e hiperglucemia; y el fenotipo delgado (LEAN), que corresponde a ratas macho homocigotas dominantes (+/+) o heterocigotas (fa/+) que además de ser delgadas tienen normoglucemia (Al-Awar et al., 2016; Capcarova, 2019).

Las ratas fueron proporcionadas por el bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde permanecieron hasta las 12 semanas de edad, correspondiente a la edad en la que las ratas *ZDF* comienzan a desarrollar DT2 (Capcarova, 2019; Wang et al., 2013).

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso ético de los animales de laboratorio.

11.6. Caracterización del modelo experimental

A las 13 semanas de edad de las ratas se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa para determinar la presencia de hiperglucemia en el modelo animal. Mediante punción capilar se recolectaron muestras de sangre de la cola de las ratas, las cuales fueron recolectadas directamente con la tira reactiva del glucómetro (CONTOUR®PLUS), para posteriormente registrar el nivel de glucosa resultante en una hoja de cálculo de Google Sheets para su almacenamiento.

La primera recolección de muestra se realizó previo al ayuno de las ratas, posteriormente las ratas permanecieron en ayuno prolongado de 6hrs con libre acceso al agua. Después del ayuno se determinó nuevamente el nivel de glucosa en sangre del animal (Tiempo 0) e inmediatamente después se administró glucosa, por vía intraperitoneal, a una concentración de **2 gr glucosa/ kg de peso del animal**. A partir de ese momento se realizaron mediciones de los niveles de glucosa en sangre cada 30 minutos (a los 30, 60, 90 y 120 minutos) (ver **Figura 5**).

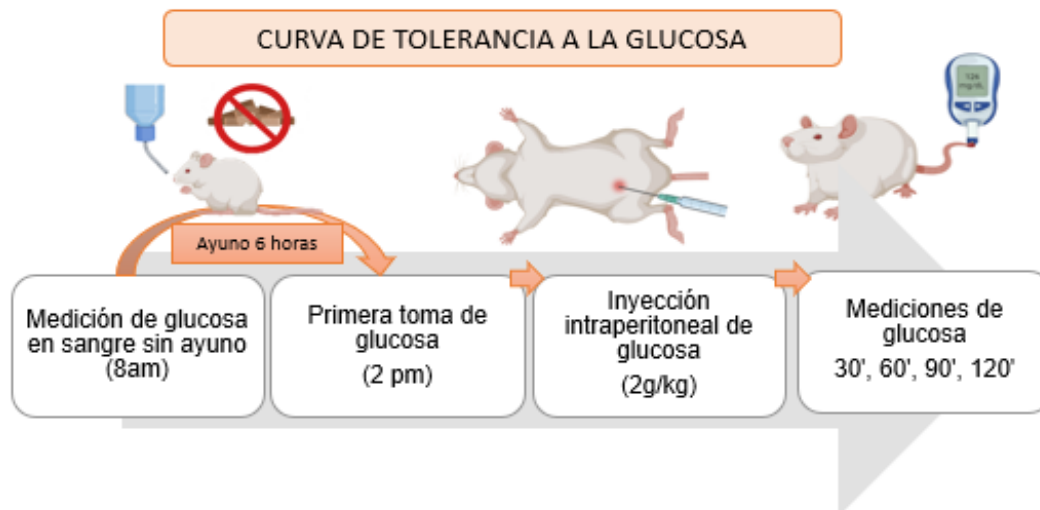


Figura 5. Diagrama de prueba de tolerancia a la glucosa

La prueba de tolerancia a la glucosa consta de la medición de los niveles de glucosa en sangre sin ayuno, posteriormente, tras 6 horas de ayuno, una segunda medición de los niveles de glucosa, seguida inmediatamente de la administración de glucosa por vía intraperitoneal (2gr/kg de peso del animal), y la medición a los 30, 60, 90 y 120 minutos de la glucosa en sangre mediante el uso de un glucómetro.

Se consideraron diabéticas aquellas ratas con niveles de glucosa superiores a **200 mg/dl**.

Así mismo, el día programado para la eutanasia y previo a la extracción de los tejidos, se evaluaron diferentes parámetros morfométricos:

- Peso corporal. Mediante el uso de una báscula se determinó el peso corporal de cada rata, en gramos.
- Longitud nasoanal. Se midió con una cinta métrica la distancia desde la nariz hasta la base de la cola, en centímetros.
- Perímetro abdominal. Se utilizó una cinta métrica para determinar el perímetro abdominal de la rata, en centímetros, mientras esta se encontraba en posición de suspensión vertical.
- Índice de masa corporal. Obtenido a partir de los resultados de longitud céfalo caudal y peso corporal, mediante la formula:

$$\text{Ecuación 1. } IMC = \frac{\text{Peso corporal}}{(\text{Longitud céfalo caudal})^2}$$

Con base a estos resultados, las ratas fueron divididas en 3 grupos, delgadas normoglucémicas (LEAN), obesas normoglucémicas (OZDF NG) y obesas hiperglucémicas (OZDF HG).

11.7. Administración del extracto

Para la administración del tratamiento las ratas se dividieron en 6 grupos:

- LEAN tratamiento
- LEAN control
- OZDF NG tratamiento
- OZDF NG control
- OZDF HG tratamiento
- OZDF HG control

Durante cuatro semanas se administró el extracto de la *Prosthechea karwinskii*, a los grupos con tratamiento, a una dosis de 300 mg/kg de peso del animal, por vía oral mediante el uso de una cánula curva.

Por otro lado, para los grupos control, durante cuatro semanas, se realizó la administración únicamente del vehículo (Solución Cloruro de Sodio 0.9%) igualmente por vía oral mediante el uso de una cánula curva.

11.8. Segunda prueba de tolerancia a la glucosa

Posterior a las 4 semanas de tratamiento se realizó una segunda prueba de tolerancia a la glucosa en las ratas, siguiendo la misma estrategia de trabajo de la primera prueba (ver **Figura 5**) y se compararon los niveles de glucosa entre los 6 grupos y con los resultados pretratamiento.

11.9. Pruebas de conducta

11.9.1. Campo abierto

Para evaluar la actividad motora se utilizó el Software ANY-maze para medir diversos parámetros durante la prueba en campo abierto, incluyendo la distancia total recorrida, la velocidad, así como el tiempo móvil e inmóvil, tanto en la periferia como en el centro del campo. La arena que se utilizó para esta prueba consistió en una caja de madera de 60 cm de ancho x 60 cm de largo x 60 cm de alto. Las pruebas se realizaron en un cuarto oscuro, cuya única fuente de iluminación fue una lámpara de luz roja. El experimento fue grabado con una cámara (Webcam USB 2K Steren) instalada en la sala de comportamiento, por arriba de la caja, y conectada a una computadora para registrar imágenes, para el posterior análisis del video.

Se limpió con etanol al 70 % antes de cada prueba, y después de la volatilización del etanol, se colocó a la rata en el centro de la arena, perimiendo que explorara libremente durante 10 minutos.

11.9.2. Prueba de reconocimiento de objeto (NORT)

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NORT, por sus siglas en inglés novel object recognition test) permite la medición de la memoria de reconocimiento en animales, utilizando la tendencia natural de los animales a explorar preferentemente objetos nuevos en comparación con los familiares (Chao et al., 2022).

Los dos días posteriores a la prueba de campo abierto se realizó la prueba de reconocimiento de objeto novedoso en la misma arena. Antes de cada prueba se limpió la caja con etanol al 70% con la finalidad de reducir las señales olfativas, así mismo, la ubicación de los objetos fue diferente para cada rata evitando un sesgo por preferencias no relacionadas a la memoria (ver **Figura 6**). Al iniciar la prueba el animal fue colocado en el centro la caja, en la primera fase (familiarización) se le permitió a la rata explorar el campo con 2 objetos idénticos

colocados de forma equidistante durante 5 minutos, 2 horas después, en la siguiente fase (memoria a corto plazo, MCP) uno de los objetos fue cambiado y se dejó a la rata explorar libremente por 5 minutos; finalmente, 24 h después, en la última fase (memoria a largo plazo, MLP), se cambió el objeto nuevo por un objeto novedoso distinto, permitiendo que la rata explorara libremente durante 5 minutos. Las pruebas se realizaron en un cuarto oscuro y fueron grabadas para su posterior análisis utilizando dos softwares, inshot (edición) y ANY-maze (análisis).

El análisis de los videos consistió en la medición del tiempo total de exploración de ambos objetos para cada sesión, así como la determinación del índice de reconocimiento para evaluar la memoria de corto y largo plazo, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación 2. } IR = \frac{TN}{TN+TC}$$

Donde IR es el índice de reconocimiento, TN es el tiempo de exploración del objeto novedoso y TC es el tiempo de exploración del objeto conocido.

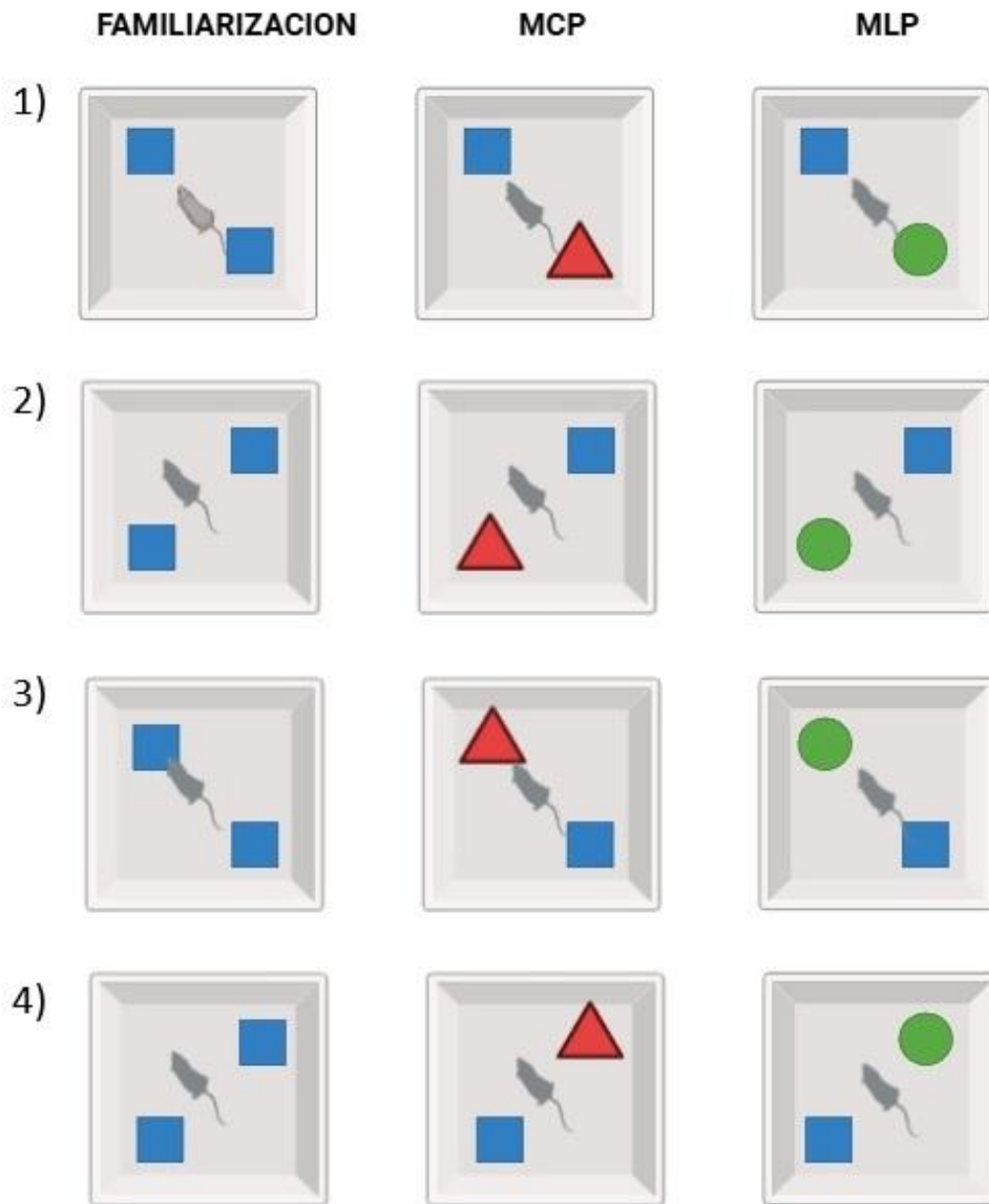


Figura 6. Posibles ubicaciones de los objetos en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso.
Se observan 4 diferentes configuraciones de ubicación de los objetos similares y novedosos en las diferentes fases de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso.

11.9.3. Laberinto elevado en cruz

El dispositivo que se utilizó para esta prueba se conformó por 4 brazos, elevados a 50 cm sobre el piso, dos de estos brazos disponían de paredes laterales de 40 centímetros de altura (Brazos cerrados) y dos no presentaban ningún borde

(Brazos abiertos) (ver **Figura 7**). Las pruebas se realizaron en un cuarto oscuro, cuya única fuente de iluminación fue una lámpara de luz roja. El experimento fue grabado con una cámara (Webcam USB 2K Steren) instalada en la sala de comportamiento, por arriba del laberinto, y conectada a una computadora para registrar imágenes para su posterior análisis.

Antes de cada prueba el laberinto fue limpiado con etanol al 70% con la finalidad de reducir las señales olfativas. Al iniciar la prueba el animal fue colocado en el centro del laberinto con la cabeza orientada hacia uno de los brazos cerrados, permitiendo su exploración libre durante 10 minutos.

Las variables por evaluar fueron: Número de entradas a los brazos abiertos, número de entradas a los brazos cerrados, tiempo en los brazos abiertos y tiempo en los brazos cerrados.

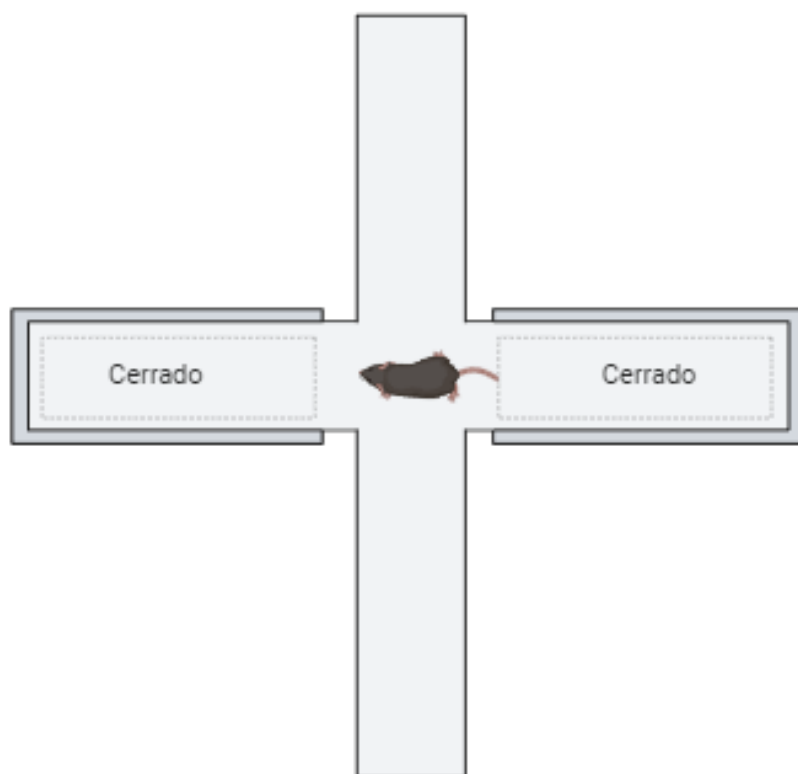


Figura 7. Conformación del laberinto elevado en cruz

Se observa un laberinto elevado en cruz que consiste en cuatro brazos, con dos brazos opuestos cerrados y dos brazos opuestos abiertos sin paredes; así como la ubicación de la rata con vista hacia un brazo cerrado al inicio de la prueba de laberinto elevado en cruz.

11.10. Extracción de tejidos

Posterior a las pruebas de conducta se realizó el procedimiento de eutanasia, con este propósito las ratas fueron anestesiadas con ketamina-xilacina, a una dosis de 0.2 ml/100gr de peso del animal y se realizó una toracotomía bilateral para lograr acceder a la cavidad torácica.

A continuación, se obtuvo una muestra de sangre de la vena cava inferior utilizando un sistema Vacutainer®, empleando una aguja calibre 21G y tubos de recolección de tapa amarilla. La muestra resultante se centrifugó y el suero obtenido se alicuotó para su posterior almacenamiento a -80°C, hasta la realización del perfil lipídico.

Una vez finalizada la obtención de la muestra de sangre, se realizó la perfusión mediante la inserción de una cánula rígida en el ventrículo izquierdo del corazón de la rata. Se estableció un flujo continuo de solución Cloruro de Sodio 0.9%, facilitando la salida de los fluidos mediante una incisión en la vena cava inferior.

Tras completar el objetivo de perfundir un volumen de aproximadamente 200 ml de solución salina, se procedió a retirar la cabeza de la rata y se diseccionó el cerebro, este se almacenó en paraformaldehído al 4% (PFA 4%) hasta su preparación para realizar las pruebas histológicas.

Así mismo, se obtuvieron la grasa epididimal e intraperitoneal para su pesaje en la balanza analítica y posterior integración a los parámetros morfométricos.

durante 5 minutos. Se realizó un enjuague con PBS (solución buffer de fosfatos) 1X por 5 minutos, seguido de la permeabilización del tejido con Tritón X-100 al 0.2% durante 5 minutos, a continuación, se hizo un lavado con PBS 1X por 5 minutos y se aplicó albumina sérica bovina (BSA) libre de IgG al 2% durante 1 hora para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos, seguidamente se realizó un enjuague con PBS 1X por 5 minutos y se incubaron las muestras con el anticuerpo primario correspondiente (ver **Tabla 3**) durante 16 horas, en una cámara húmeda cerrada. Después de la incubación, se realizó un enjuague con PBS 1X durante 5 minutos y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario Rodamina durante 2 horas. Seguido de esto un último enjuague en PBS 1X durante 5 minutos, finalizando con la aplicación del medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, que permitió la colocación de los núcleos), así como la colocación de un cubreobjetos y esmalte para evitar el movimiento de este último (ver **Figura 9**).

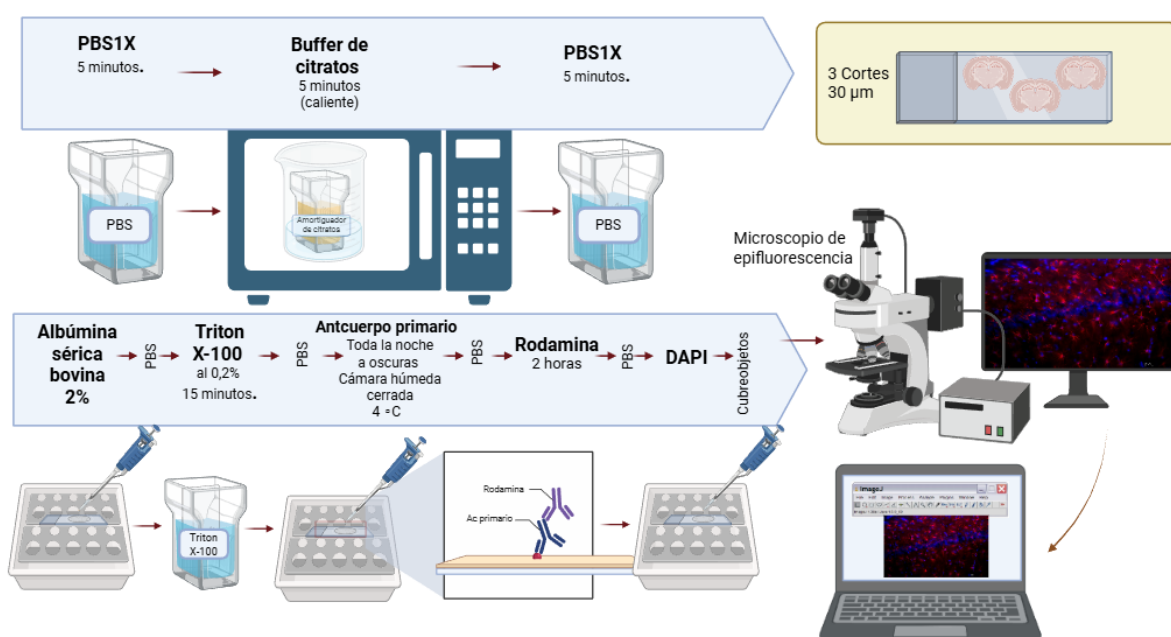


Figura 9. Diagrama del protocolo empleado para las pruebas de inmunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia constan del desenmascaramiento de antígenos con buffer de citratos, permeabilización con tritón, bloqueo con albumina sérica bovina al 2%, incubación con anticuerpo primario (anti-BDNF, anti-SYP o anti-GFAP), incubación con anticuerpo secundario Rodamina que contiene al fluoróforo y montaje con DAPI, para la captura de microfotografías con un microscopio de epifluorescencia y su posterior análisis en el programa Image J- Fiji.

Se realizaron 3 diferentes pruebas de inmunofluorescencia siguiendo las indicaciones del fabricante, cada una de ellas en al menos 4 ratas por grupo, y en 2

a 4 cortes por cada rata. Los anticuerpos utilizados y fabricante, así como su concentración se pueden visualizar en la siguiente tabla (**Tabla 3**).

Protocolo	Anticuerpo		Fabricante		[Ab]	Dilución
Anticuerpo primario	BDNF	Anti-BDNF [3B2]	antibody	Abcam	1 mg/ml	1:250
	GFAP	GFAP Anticuerpo (GA-5): sc-58766		Santa Cruz Biotechnology	200 µg/ml	1:150
	SYP	SYP/Synaptophysin Anticuerpo (D-4): sc-17750		Santa Cruz Biotechnology	200 µg/ml	1:150
Anticuerpo secundario	Rodamina	Rhodamine (RRX) Goat Anti-Mouse (H+L)	Red™-X AffiniPure®	Jackson Immuno Research	1.5 mg/ml	1:200
Montaje	Medio de montaje con DAPI	UltraCruz® Mounting Medium with DAPI	Aqueous	Santa Cruz Biotechnology	1.5 µg/ml	No aplica

Tabla 3. Anticuerpos utilizados y su concentración

Se presentan los anticuerpos primarios y secundario utilizados, así como el medio de montaje, así como el fabricante, la concentración y la dilución utilizada para cada uno de ellos.

11.11.2. Captura de las microfotografías

Posterior al marcaje con inmunofluorescencia de BDNF, GFAP y SYP, se procedió con la captura de microfotografías de las regiones hipocampales: CA1, CA3 y GD. Los cortes histológicos se observaron a 20X con el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800 del laboratorio de microscopía del Instituto de

Fisiología, y se capturaron las microfotografías con el software Motic Images Plus 3.0.

Para la visualización de la marca con Rodamina, se utilizó el conjunto de filtros de fluorescencia Nikon B-2A, este posee una longitud de onda del filtro de excitación de 450-490 nanómetros (paso de banda, 470 CWL), longitud de onda de corte del espejo dicromático de 500 nanómetros (paso largo) y una longitud de onda de corte del filtro de barrera de 515 nanómetros (paso largo) (Nikon Instruments Inc., 2025a). Así la configuración de filtros fue adecuada para Rodamina que presenta un pico de excitación a 570 nm y un pico de emisión a 590 nm (Jackson ImmunoResearch, 2025).

Para la visualización de los núcleos con DAPI se utilizó a combinación de filtros de emisión de paso largo Nikon UV-1A, que posee una longitud de onda del filtro de excitación de 360-370 nanómetros, longitud de onda de corte del espejo dicromático de 380 nanómetros (paso largo) y longitud de onda de corte del filtro de barrera de 420 nanómetros (paso largo, LP) (Nikon Instruments Inc., 2025b). De esta manera la configuración de filtros fue adecuada para DAPI que posee una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm (Santa Cruz Biotechnology, 2025).

11.12. Protocolos experimentales por objetivo

Objetivo 1. Se determinaron los niveles de glucosa en sangre de las ratas y se compararon los grupos tratados con los no tratados y entre cada fenotipo de rata.

Objetivo 2. Se evaluaron los niveles colesterol, triglicéridos, HDL-c, LDL-c y VLDL-c en el suero, utilizando espectrofotometría; y se realizó una comparación entre los grupos tratados y control, así como entre los fenotipos de rata.

Objetivo 3a. Se evaluó la actividad exploratoria de cada rata mediante el análisis de los videos correspondientes a la prueba de campo abierto y se compararon los grupos tratados y control, así como los fenotipos de rata.

Objetivo 3b. Se evaluó la memoria de corto y largo plazo de cada rata mediante el análisis de los videos correspondientes a la prueba NORT y se realizó una comparación entre los grupos tratados y control, así como entre los fenotipos de rata.

Objetivo 3c. Se evaluó la ansiedad de cada rata mediante el análisis de los videos correspondientes a la prueba de laberinto elevado en cruz y se realizó una comparación entre los grupos tratados y control, así como entre los fenotipos de rata.

Objetivo 4. Se cuantificó la densidad celular en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal utilizando las microfotografías correspondientes a DAPI de todas las pruebas de inmunofluorescencia; y se realizó una comparación entre los grupos tratados y control, así como entre los fenotipos de rata.

Objetivo 5. Se valoraron los niveles de BDNF en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal utilizando las microfotografías correspondientes a Rodamina; y se realizó una comparación entre los grupos tratados y control, así como entre los fenotipos de rata.

Objetivo 6. Se cuantificó la astrogliosis en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal utilizando las microfotografías correspondientes a Rodamina; y se realizó una comparación entre los grupos tratados y control, así como entre los fenotipos de rata.

Objetivo 7. Se evaluaron los niveles de SYP en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del Hipocampo Dorsal utilizando las microfotografías correspondientes a Rodamina y se realizó una comparación entre los grupos tratados y control, así como entre los fenotipos de rata.

11.13. Análisis de datos

Los parámetros morfométricos se almacenaron en hojas de cálculo de Google sheets hasta su análisis en GraphPad Prism 5.0.

El análisis de los videos de las pruebas de conducta se realizó manualmente y con el software ANY-maze, los datos obtenidos se recopilaron en Hojas de cálculo de Google Sheets y posteriormente se analizaron en GraphPad Prism 5.0.

La evaluación de la densidad neuronal se realizó mediante el análisis de microfotografías de inmunofluorescencia, que presentaron marcaje de los núcleos con DAPI. Se utilizó el software ImageJ Fiji para la detección de ROIs (Regiones de interés en ImageJ, en este caso los núcleos con DAPI) (ver Anexos, Determinación de ROIs). El análisis de los resultados se realizó en el programa GraphPad Prism 5.0.

Para el análisis de microfotografías de inmunofluorescencia y cuantificación de astrocitos reactivos, se utilizó el software ImageJ Fiji, mediante la selección manual de ROIs (ver Anexos, Determinación de ROIs). Para el análisis de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0.

La cuantificación de BDNF y SYP se realizó indirectamente mediante el análisis de microfotografías de inmunofluorescencia y la detección de ROIs (Regiones de interés en ImageJ, en estos casos los puntos más brillantes) utilizando el software ImageJ Fiji, de esta manera, el número de ROIs obtenido es proporcional a la concentración de BDNF o SYP (ver Anexos, Determinación de ROIs). Para el análisis de todos los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0.

Después de la obtención de los valores de absorbancia del perfil lipídico, se realizó la conversión a unidades de concentración (mg/dl) como se indica en los protocolos, los resultados se recopilaron en Hojas de cálculo de Google Sheets y finalmente se analizaron en GraphPad Prism 5.0.

11.14. Diseño estadístico

11.14.1. Hipótesis estadística

Hipótesis nula (H_0): Los compuestos bioactivos de la *Prosthechea karwinskii* no tienen efectos sobre la conducta, así como en las regiones CA1, CA3 y Giro

Dentado del hipocampo, y sobre los niveles de glucosa y lípidos de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.

Hipótesis alternativa (H_A): Los compuestos bioactivos de la *Prosthechea karwinskii* tienen efectos sobre la conducta, ni en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del hipocampo, y sobre los niveles de glucosa y lípidos de ratas *Zucker Diabetic Fatty*.

11.14.2. Prueba estadística

Se utilizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para verificar que los datos pertenecen a una población distribuida normalmente, utilizando la prueba de ANOVA para datos normales o su equivalente no paramétrico, la prueba de Kruskal-Wallis, para datos sin una distribución normal, comparando los resultados de los 6 grupos para cada prueba.

12. Resultados

12.1. Curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento

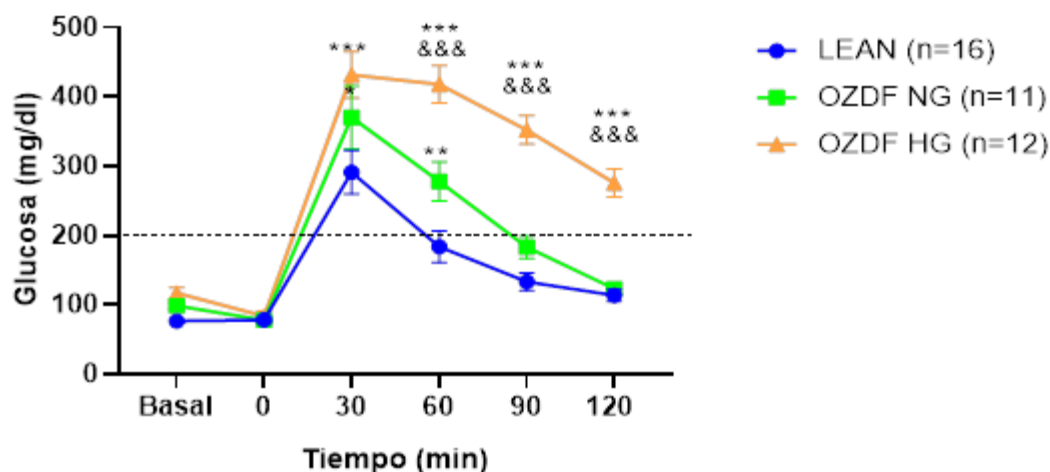
En la **Figura 10** se presenta la curva de tolerancia a la glucosa de las ratas previo a ser tratadas, a partir de esta prueba se evidenciaron diferencias significativas en el estado de glucemia de las ratas permitiendo la división de grupos (Wang et al., 2014). Con base en el peso de las ratas y el nivel de glucemia en la curva de tolerancia a la glucosa se pudo dividir a las ratas en tres grupos: LEAN (línea azul), que son delgadas y con niveles de glucosa normales, OZDF NG (línea verde), que son obesas y con niveles de glucemia normales y OZDF HG (línea naranja), que son ratas obesas y con hiperglucemia. El grupo OZDF HG (línea naranja) presenta concentraciones de glucosa en sangre elevadas, con diferencias significativas al compararse con el grupo delgado (LEAN, línea azul) desde los 30 minutos de la prueba, así mismo presenta diferencias significativas al compararse con el grupo OZDF NG (línea verde) desde los 60 minutos de la prueba, además, a las dos horas de la prueba, el grupo OZDF HG no logró disminuir su nivel de glucosa a una concentración por debajo de los 200 mg/dl, lo cual es considerado un criterio para el diagnóstico de la Diabetes (American Diabetes Association, 2026). Por otro lado, a pesar de su condición de obesidad, el grupo OZDF NG presentó niveles de glucosa similares al grupo LEAN (90 y 120 minutos) y, a las 2 horas de la prueba de tolerancia a la glucosa, logró disminuir su nivel de glucosa a una concentración por debajo de los 200 mg/dl, al igual que el grupo delgado.

Con la finalidad de visualizar que no hubo sesgos en la división de los grupos, en control (VH) y tratamiento (TX), se utilizaron los mismos datos para generar una nueva curva de tolerancia a la glucosa con los 6 nuevos grupos, así en el panel **B**, se puede observar que no hubo diferencia significativa entre el grupo delgado control (LEAN VH, línea azul) y el grupo delgado tratamiento (LEAN TX, línea roja); entre el grupo obeso normoglucémico control (OZDF NG VH, línea verde) y el grupo obeso normoglucémico tratamiento (OZDF NG TX, línea morada); ni entre el grupo

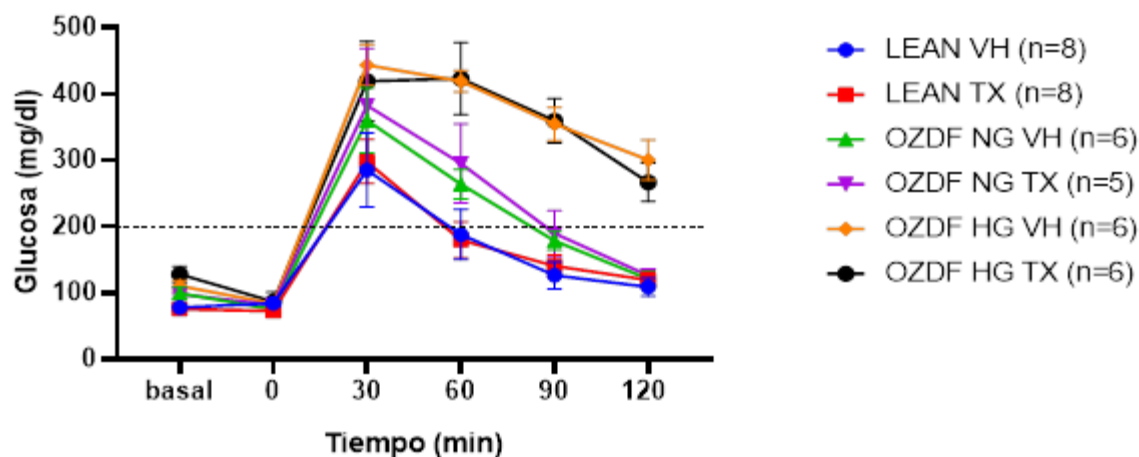
obeso hiperglucémico control (OZDF HG VH, línea naranja) y el grupo obeso hiperglucémico tratamiento (OZDF NG TX, línea negra).

Además, al evaluar el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa previa al tratamiento (ver panel **C**), se constatan las diferencias significativas entre los grupos normoglucémico (LEAN y OZDF NG) y el grupo hiperglucémico (OZDF HG). Así como, al comparar los grupos TX con su respectivo grupo VH, no se encontraron diferencias significativas, mostrando que la subdivisión de los grupos no presenta sesgos. En adición, la comparación del área bajo la curva entre los grupos LEAN y OZDF NG, no presenta diferencias significativas.

A) CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA PRETRATAMIENTO



B) CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA PRETRATAMIENTO



C) ÁREA BAJO LA CURVA PRETRATAMIENTO

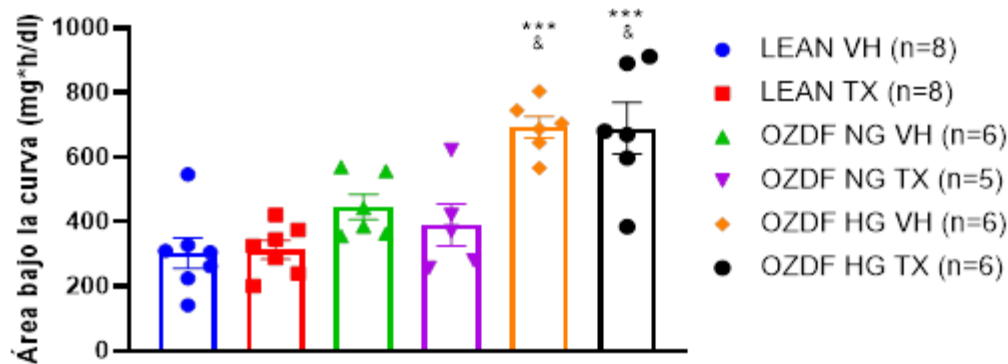


Figura 10. Curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento.

Media $\pm$ EE de los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa, de las ratas Zucker Diabetic Fatty a las 13 semanas de edad, previo al tratamiento. A) Curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento, se observa la

división de población en tres grupos de ratas: Delgadas con niveles de glucosa normales (LEAN), Obesas con niveles de glucosa normales (OZDF NG) y Obesas con hiperglucemia (OZDF HG) *** $p \leq 0.0005$ vs grupo LEAN (prueba ANOVA de dos vías); &&& $p \leq 0.0005$ vs grupo OZDF NG (prueba ANOVA de una vía). B) curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento en subgrupos, no se observa diferencia significativa entre los grupos tratamiento (TX) y sus correspondientes grupos control (VH) (prueba Anova de 2 vías). C) área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa pretratamiento *** $p \leq 0.0005$ vs grupo LEAN (prueba ANOVA de una vía); & $p \leq 0.05$ vs grupo OZDF NG (prueba ANOVA de una vía).

12.2. Parámetros morfométricos

En la **Tabla 4** se pueden observar los resultados, como la media $\pm$ error estándar (EE), de los parámetros morfométricos de las ratas, los cuales permiten la diferenciación de los fenotipos reportados en esta tesis, así como la evaluación del tratamiento sobre los mismos.

Parámetro/ grupo	LEAN	LEAN TX	OZDF	OZDF	OZDF	OZDF
	VH		NG VH	NG TX	HG VH	HG TX
Peso (g)	328.4 $\pm$ 13.01	341.6 $\pm$ 7.93	530 $\pm$ 16.67 *** &&&	505.4 $\pm$ 18.63 *** &&&	499.2 $\pm$ 13.99 *** &&&	517.3 $\pm$ 19.78 *** &&&
Perímetro abdominal (cm)	15.75 $\pm$ 0.31	16.19 $\pm$ 0.30	21.58 $\pm$ 0.43 ** &	21.5 $\pm$ 0.31 ** &	21.5 $\pm$ 0.22 ** &	20.33 $\pm$ 0.42
Longitud nasoanal (cm)	23.13 $\pm$ 0.44	23.78 $\pm$ 0.24	24.5 $\pm$ 0.19	24.42 $\pm$ 0.33	23.79 $\pm$ 0.38	24.21 $\pm$ 0.46
IMC (g/cm²)	0.61 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.03 *** &&&	0.86 $\pm$ 0.01 *** &&&	0.89 $\pm$ 0.02 *** &&&	0.89 $\pm$ 0.03 *** &&&
Grasa epididimal (g)	3.55 $\pm$ 0.33	3.29 $\pm$ 0.36	14.28 $\pm$ 1.92 *** &&&	12.24 $\pm$ 1.90 *** &&&	15.99 $\pm$ 0.47 *** &&&	13.46 $\pm$ 1.55 *** &&&

Grasa	2.2	± 2.75	± 19.09	± 19.41	± 19.32	± 21.7	±
retroperitoneal	0.61	0.25	1.01	1.65	0.73	1.69	
(g)			***	***	***	***	
			&&&	&&&	&&&	&&&	
N	8	8	6	5	6	6	

Tabla 4. Características de la rata Zucker Diabetic Fatty.

Media ± EE de los parámetros morfométricos de las ratas Zucker Diabetic Fatty a las 17 semanas de edad. El índice de masa corporal (IMC) se calculó según la ecuación descrita en Materiales y Métodos. ** $p \leq 0,005$ VS LEAN VH; *** $p \leq 0,0005$ VS LEAN VH; & $p \leq 0,05$ VS LEAN TX; &&& $p \leq 0,0005$ VS LEAN TX (prueba ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis).

Se observan diferencias significativas entre los grupos LEAN y los grupos OZDF en los siguientes parámetros: peso, perímetro abdominal, IMC, peso de grasa epididimal, así como grasa retroperitoneal, lo que se debe a la obesidad característica del modelo que ha sido reportada en la literatura (Al-Awar et al., 2016; Berra-Romani et al., 2019; Wang et al., 2014). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en estos parámetros entre los grupos VH y los grupos TX correspondientes. Así mismo no se encontraron diferencias significativas en la longitud nasoanal entre ningún grupo.

Así, la presencia de obesidad en las ratas OZDF se demostró por el aumento del peso corporal, la circunferencia abdominal y el peso de la grasa epididimaria y retroperitoneal en ratas OZDF al compararse con el grupo LEAN, mientras que la confirmación de DT2 en ratas OZDF HG se realizó mediante la prueba de tolerancia a la glucosa con valores por encima de los 200 mg/dl de glucosa en sangre a las 2 horas de la prueba. En conjunto, estos resultados demuestran que las ratas OZDF NG presentan obesidad, y que las ratas OZDF GH presentan obesidad y Diabetes.

12.2.1. Aumento de peso

Además de determinar los parámetros morfométricos anteriores, se monitoreó el peso de las ratas, antes, durante y después del tratamiento, los datos obtenidos fueron graficados como la media ± EE de los pesos de las ratas (ver **Figura 11A**). Se puede observar que desde el inicio del tratamiento (semana 0) los grupos OZDF (líneas verde, morada, naranja y negra) presentaron mayor peso con

respecto a las ratas LEAN (líneas azul y roja) lo cual era esperado debido al modelo utilizado.

Para una mejor visualización de los cambios del peso con respecto al tiempo, así como el efecto del tratamiento, se determinó el porcentaje de aumento de peso mediante la siguiente ecuación (Salleh et al., 2022; Wachal et al., 2020):

$$\text{Aumento de peso (\%)} = \frac{\text{peso} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Esta ecuación permitió observar el porcentaje de aumento de peso de los animales teniendo como referente al peso de la rata previo a la primera curva de tolerancia a la glucosa.

En el panel **B**, se muestra el valor de la media $\pm$ EE del porcentaje de aumento de peso por semana de las ratas, en el eje “X” se observan las semanas de tratamiento, mientras que en el eje “Y” se observa el porcentaje de aumento de peso de las ratas. Tras una semana de tratamiento no hubo diferencias significativas en el aumento de peso de las ratas. Después de 2 y 3 semanas de tratamiento tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de aumento de peso entre los grupos control (VH) y los tratados (TX), sin embargo, se aprecia una diferencia significativa entre las ratas delgadas (LEAN VH, azul; LEAN TX, rojo) y Obesas (OZDF NG VH, verde; OZDF HG VH, naranja; OZDF HG TX, negro), excepto en el caso del grupo OZDF normoglucémico tratamiento (morado). Después de cuatro semanas de tratamiento se observan diferencias significativas entre los grupos LEAN y OZDF, y entre el grupo OZDF NG VH (verde, 31.49 ± 4.571) y su grupo control (OZDF NG TX, morado, 20.68 ± 7.591).

Estos resultados demuestran que en ratas OZDF NG el extracto disminuyó el porcentaje de aumento de peso.

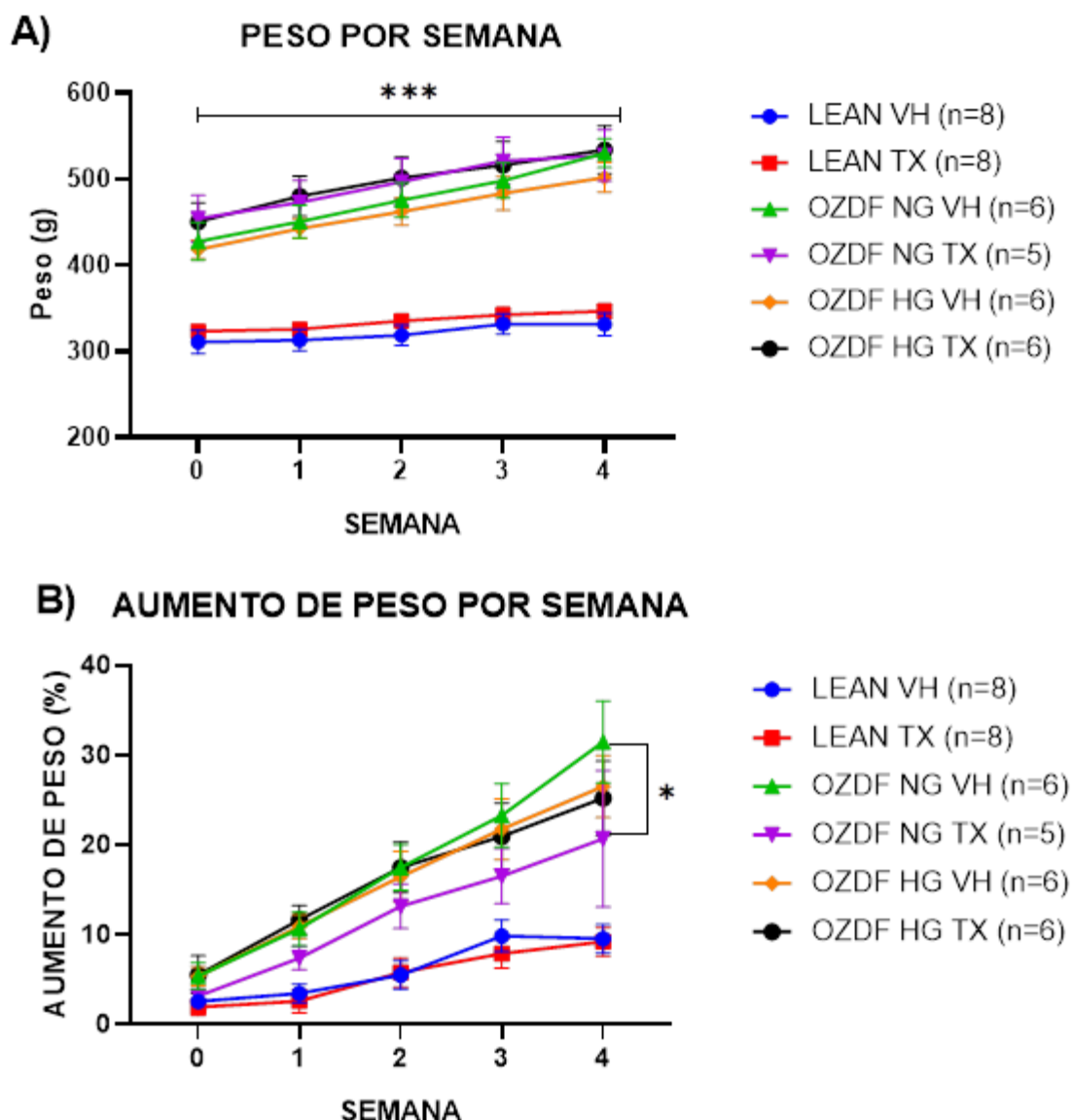


Figura 11. Peso por semana.

Media $\pm$ EE del peso de las ratas Zucker Diabetic Fatty durante el tratamiento de 4 semanas con extracto de la orquídea *Prosthechea karwinskii*. A) Aumento de peso de las ratas por semana en gramos, *** $p \leq 0,0005$ grupos OZDF VS grupos LEAN (prueba ANOVA de dos vías). B) Porcentaje de aumento de peso por semana * $p \leq 0,05$ grupo OZDF NG VH VS grupos OZDF NG TX (prueba Anova de 2 vías).

12.3. Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento

En la **Figura 12** se presenta la curva de tolerancia a la glucosa de las ratas posterior al tratamiento, donde nuevamente tanto los grupos LEAN (Línea azul y roja) como los OZDF NG (línea verde y morada) tienen los niveles similares de

glucosa en sangre y logran llegar a un valor menor a 200 mg/dl de glucosa a las dos horas de la prueba de tolerancia a la glucosa. Por otro lado, las ratas OZDF HG VH presentaron niveles significativamente mayores de glucosa a los 90 (295.5 mg/dl) y 120 (282.6 mg/dl) minutos de la prueba, con respecto al grupo LEAN VH (155.6 a los 90 y 117.5 mg/dl a los 120 minutos); mientras que, únicamente a los 120 minutos, presentaron niveles de glucosa significativamente mayores, las ratas OZDF HG TX (236.0 mg/dl) que las ratas LEAN VH (117.5 mg/dl).

Para una mejor visualización los efectos del tratamiento, se procedió con la comparación por separado de cada grupo TX con su respectivo grupo VH (panel **B-D**). A pesar de que no hubo diferencias significativas entre los grupos VH y TX, se puede observar que, en el caso de las ratas obesas hiperglucémicas (ver figura panel **D**), el grupo tratamiento (línea negra) muestra una tendencia a presentar niveles de glucosa menores que el grupo control (línea naranja).

Se procedió a evaluar el área bajo la curva (ABC) de la prueba de tolerancia a la glucosa postratamiento, y se comparó con el área bajo la curva obtenida en la prueba de tolerancia a la glucosa pretratamiento (panel **E**), así, en las ratas OZDF HG TX, se observa que hubo una diferencia significativa entre el ABC de la curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento (689.6 ± 79.92) y postratamiento (450.7 ± 21.16), lo que sugiere que la administración del extracto de *Prosthechea karwinskii* tuvo un efecto hipoglucemiante sobre los niveles de glucosa en sangre de las ratas OZDF HG TX, al ser comparadas con su control.

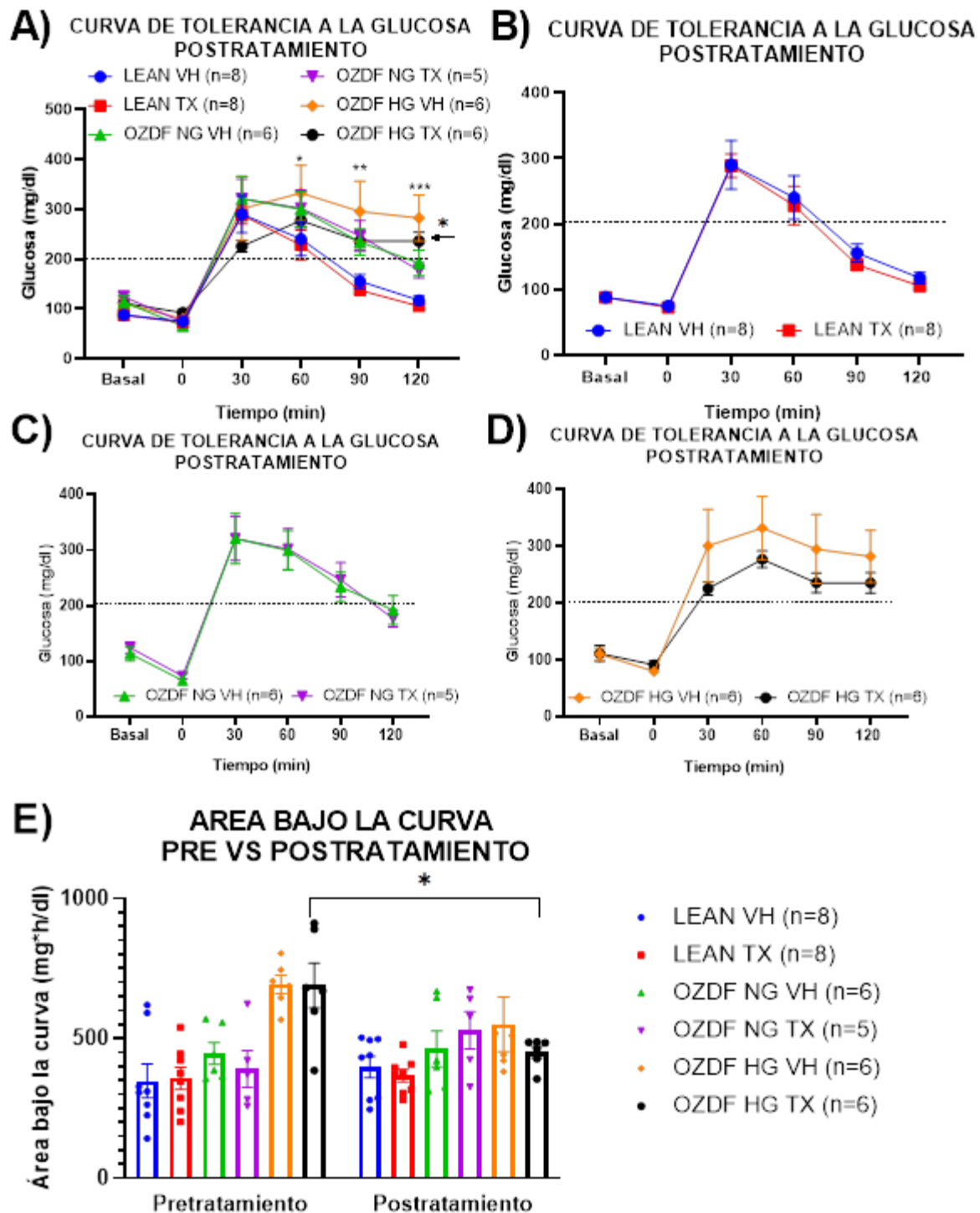


Figura 12. Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento.

Media $\pm$ EE de los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa, de las ratas Zucker Diabetic Fatty después de 4 semanas de tratamiento con el extracto de orquídea *Prosthechea karwinskii*. A) Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento, se observan todos los grupos * $p \leq 0.05$ vs LEAN VH; ** $p \leq 0.005$ vs LEAN VH; *** $p \leq 0.0005$ vs LEAN VH (prueba ANOVA de dos vías). B) Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento en ratas LEAN tratadas (LEAN TX) y su correspondiente grupo control (LEAN VH), no se observan diferencias

significativas (prueba Anova de 2 vías). C) Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento en ratas OZDF normoglucémicas tratadas (OZDF NG TX) y su correspondiente grupo control (OZDF NG VH), no se observan diferencias significativas (prueba Anova de 2 vías). D) Curva de tolerancia a la glucosa postratamiento en ratas OZDF hiperglucémicas tratadas (OZDF HG TX) y su correspondiente grupos control (OZDF HG VH), no se observan diferencias significativas (prueba Anova de 2 vías). D) área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa pretratamiento y postratamiento * $p \leq 0.05$ (prueba ANOVA de dos vías).

12.4. Prueba de Campo abierto

12.4.1. Actividad motora

En la **Figura 13 A**, se muestra, como la media $\pm$ EE, la distancia total recorrida durante la prueba de campo abierto. A pesar de que los grupos obesos, presentan valores inferiores a los grupos delgado, la prueba no mostró diferencias significativas entre los grupos tratamientos y control, ni entre los fenotipos, lo que sugiere que las ratas *ZDF* no tienen deficiencias locomotoras (Tekwe et al., 2013).

Por otro lado, en la **Figura 13 B** se presenta, como la media $\pm$ EE, la velocidad media durante la prueba de campo abierto; se observa que, a pesar no encontrar diferencias significativas en la distancia recorrida, los grupos presentan diferentes velocidades, en el caso de las ratas obesas normoglucémicas tratamiento (OZDF NG TX, morado, 7.18 ± 0.11) tienen una velocidad significativamente menor que las ratas delgadas tratamiento (LEAN TX, rojo, 9.60 ± 0.58) y que las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento (OZDF HG TX, negro, 10.07 ± 0.26). Adicionalmente al comparar al grupo obeso hiperglucémico control (OZDF HG VH, naranja, 7.96 ± 0.71) con el obeso hiperglucémico tratamiento (OZDF HG TX negro, 10.07 ± 0.26) se observa que el tratamiento es significativamente más veloz ($p < 0.05$, prueba Anova de una vía).

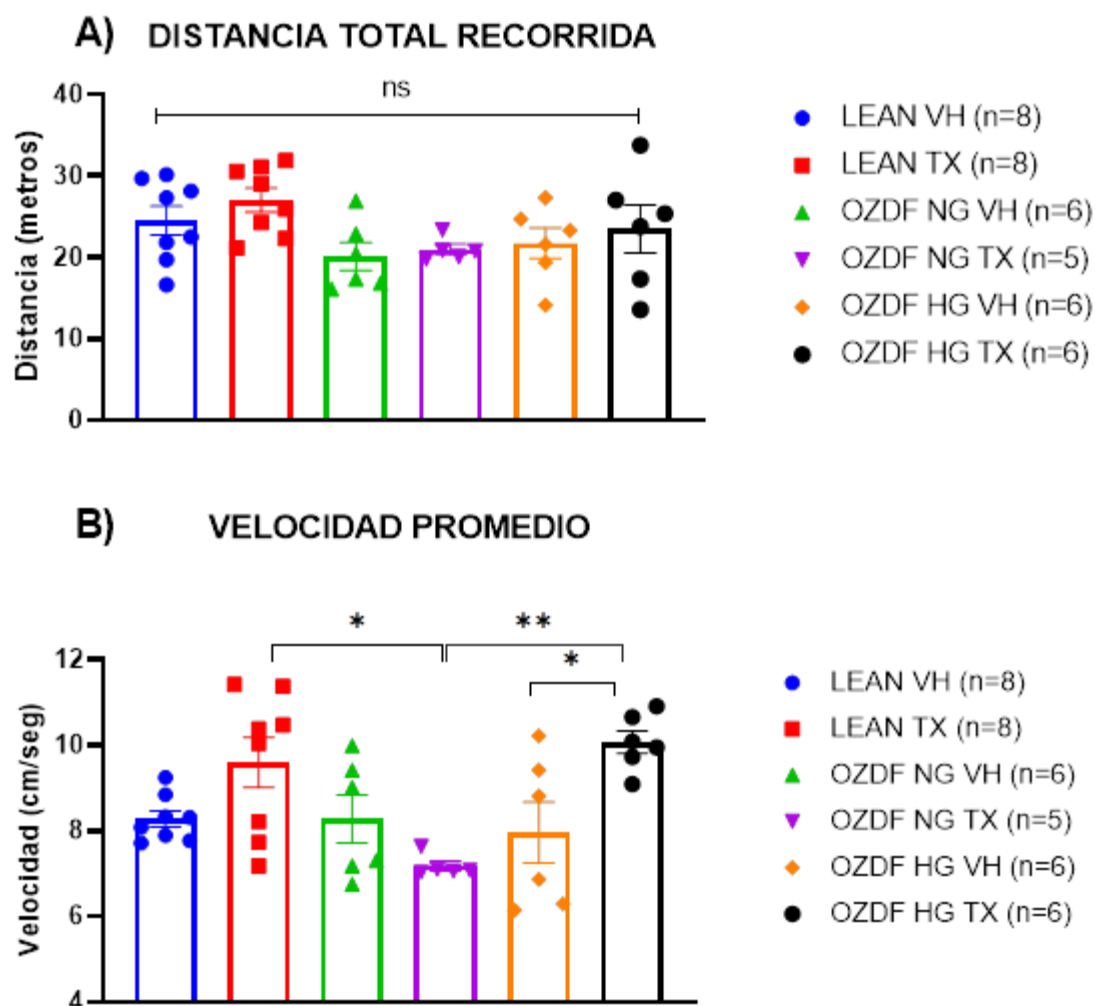


Figura 13. Actividad motora.

Media $\pm$ EE de los resultados de actividad motora, en la prueba de campo abierto, de las ratas Zucker Diabetic Fatty después del tratamiento de 4 semanas con extracto de la orquídea *Prosthechea karwinskii*. A) Distancia total recorrida durante la prueba de campo abierto, no hubo diferencias significativas entre los grupos (prueba ANOVA de dos vías). B) Velocidad media durante la prueba de campo abierto. * $p < 0.05$; ** $p < 0.05$ (prueba Anova de una vía).

12.4.2. Conductas relacionadas con la ansiedad/exploración

En la **Figura 14.A**, se muestra, como la media $\pm$ EE, el porcentaje de tiempo móvil de las ratas; la prueba mostró una diferencia significativa entre el grupo delgado control (LEAN VH, azul, 59.83 ± 2.949) y el grupo Obeso hiperglucémico tratamiento (OZDF HG TX, negro, 40.67 ± 4.287) ($p < 0.05$, prueba Anova de una vía). En la **Figura 14.B** se presenta, como la media $\pm$ EE, la tigmotaxis (tendencia de un sujeto a permanecer cerca de las paredes) durante la prueba de campo

abierto; no se observan diferencias significativas entre los grupos, debido a esto se puede concluir que el tratamiento no tiene efectos en las conductas asociadas a la ansiedad.

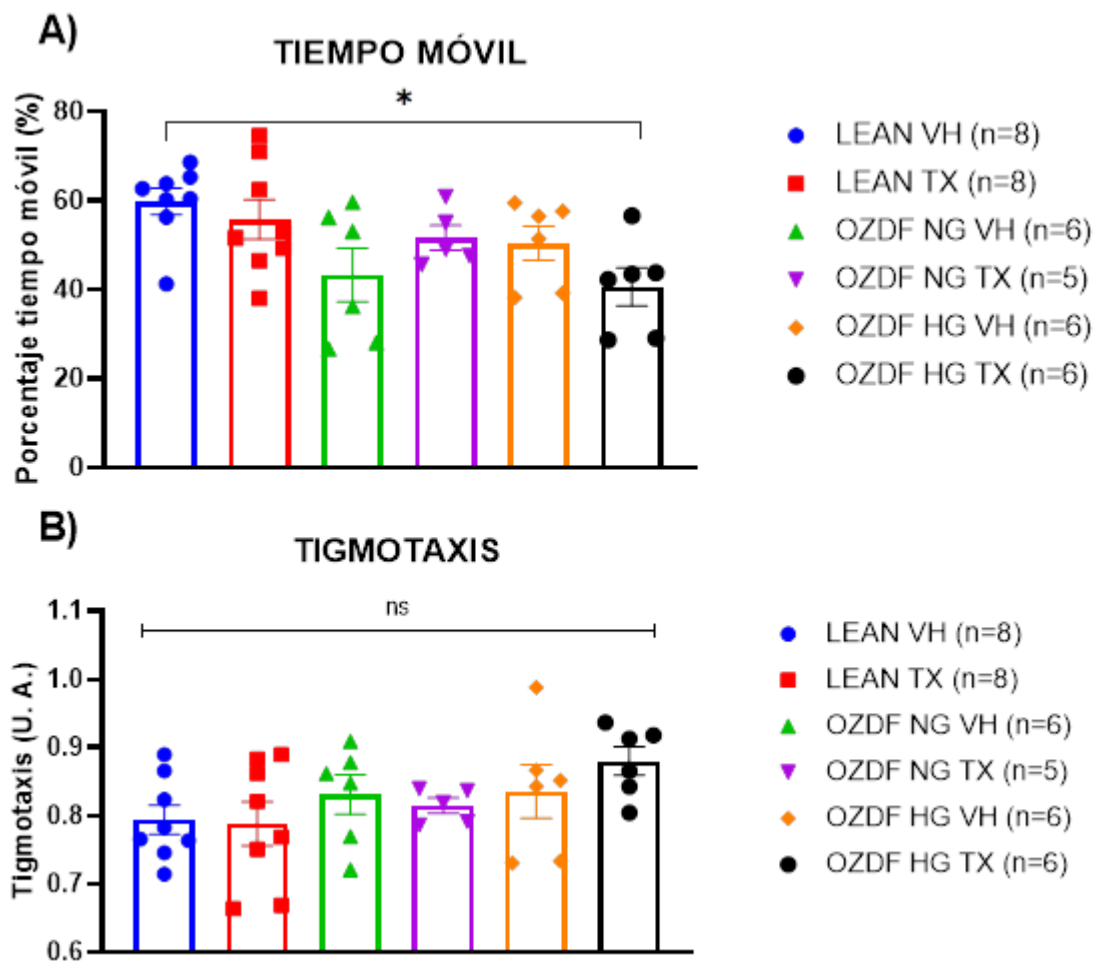


Figura 14. Conductas relacionadas con la ansiedad.

Media $\pm$ EE de las conductas asociadas con ansiedad en la prueba de campo abierto, de las ratas Zucker Diabetic Fatty después del tratamiento de 4 semanas con extracto de orquídea de *Prosthechea karwinskii*. A) El porcentaje de tiempo móvil de las ratas den la prueba de campo abierto, $*p<0.05$ (prueba Anova de una vía). B) La tigmotaxis (tendencia de la rata a permanecer cerca de las paredes) durante la prueba de campo abierto, no hay diferencias significativas entre los grupos (prueba Anova de una vía).

12.5. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

En la **Figura 15**, se muestra, como la media $\pm$ EE, el índice de reconocimiento (IR) obtenido mediante la formula previamente reportada en la sección de material y métodos, de las ratas ZDF en las diferentes fases de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, donde un valor alto indica un buen desempeño en la memoria

y un valor cercano a 0 sugiere la ausencia de memoria de reconocimiento. En **A** se aprecian las 3 fases de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, donde el aumento en el Índice de reconocimiento entre la fase de familiarización (FAM) y las fases de memoria a corto (MCP) o largo plazo (MLP) indica un buen desempeño en la memoria. Aunque no existen diferencias significativas entre las fases dentro de cada grupo, visualmente se pueden determinar diferencias entre los grupos evaluados, siendo el resultado más prometedor el de las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento (OZDF HG TX, negro) que presentan un aumento en su índice de reconocimiento, mientras que en su grupo control (OZDF HG VH, naranja) presenta una disminución en el índice de reconocimiento.

En **B**, se muestra que, al realizar comparaciones entre los grupos, en la fase de memoria a largo plazo, la rata OZDF HG TX (negro, 0.59 ± 0.02) presenta una diferencia significativa en su índice de reconocimiento al ser comparada con su grupo control OZDF HG VH (naranja, 0.40 ± 0.04), lo que indicaría que la administración del extracto de *Prosthechea karwinskii* tuvo efecto sobre la memoria de reconocimiento en ratas OZDF hiperglucémicas, al presentar un IR significativamente mayor que su control.

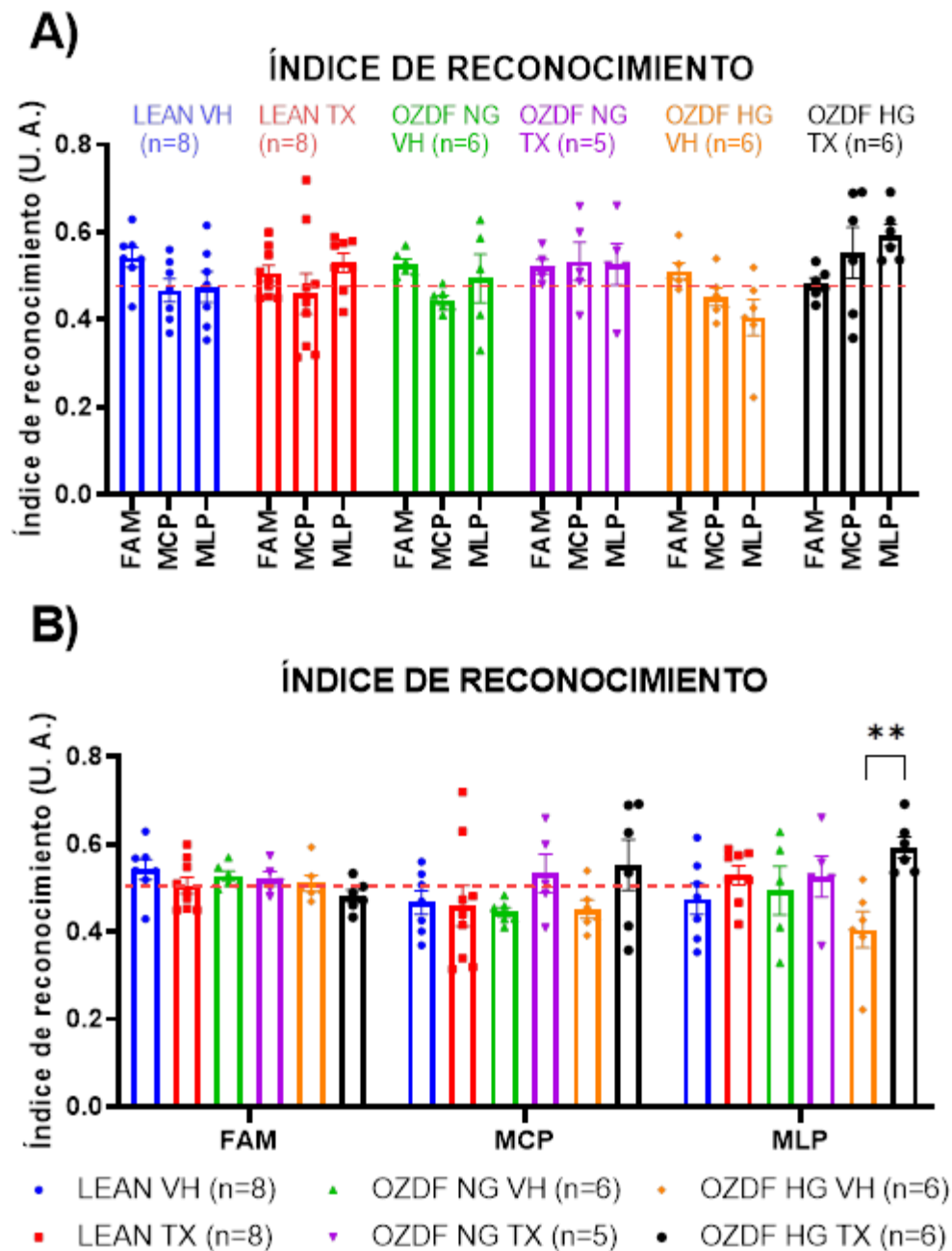


Figura 15. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso.

Media $\pm$ EE del índice de reconocimiento obtenido por las ratas Zucker Diabetic Fatty, durante la prueba de reconocimiento de objeto novedoso después del tratamiento de 4 semanas con extracto de la orquídea *Prosthechea karwinskii*. A) Resultados por grupo de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso B) Resultados por fase de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. ** $p < 0.05$ (prueba Anova de dos vías).

12.6. Laberinto elevado en cruz

La **Figura 16**, muestras los resultados obtenidos en la prueba de laberinto elevado en cruz como la media $\pm$ EE. En el panel **A** se evaluó el número de entradas a cada región del laberinto, se observa preferencia por los brazos cerrado (una conducta normal), sin embargo, no existen diferencias significativas entre los grupos. En el panel **B**, también se observa una marcada preferencia de todas las ratas a permanecer en los brazos cerrados durante la mayor parte del tiempo de la prueba, sin embargo, no se observan diferencias significativas, en el tiempo de permanencia en cada zona, entre los diferentes grupos. De esta forma se puede decir que el tratamiento no produjo cambios en la conducta relacionada a la ansiedad.

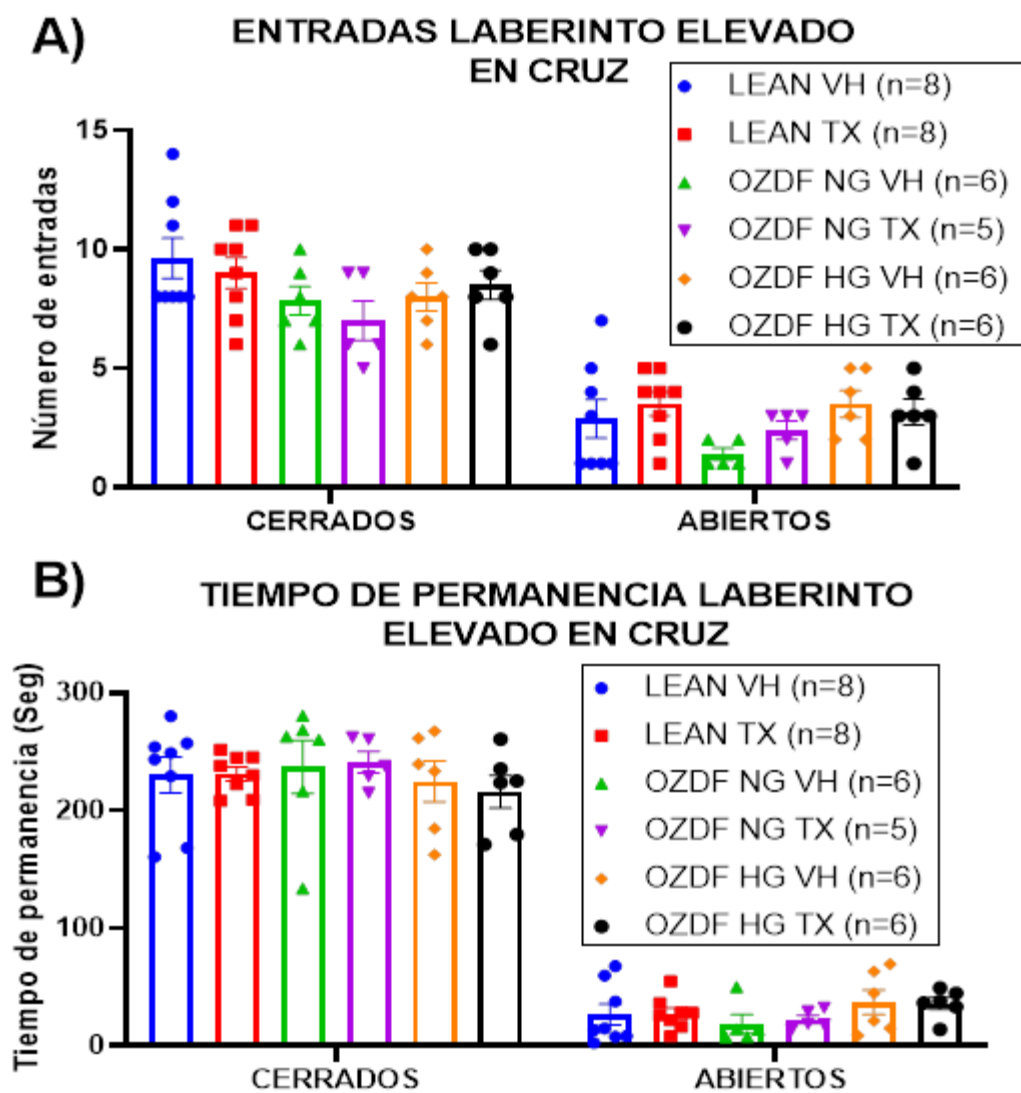


Figura 16. Prueba de laberinto elevado en cruz.

Media $\pm$ EE de los resultados obtenidos por las ratas Zucker Diabetic Fatty, durante la prueba de laberinto elevado en cruz, después del tratamiento de 4 semanas con extracto de la orquídea *Prosthechea karwinskii*. A) Número de entradas a cada zona del laberinto elevado en cruz $**p < 0.05$ (prueba Anova de dos vías). B) Tiempo de permanencia en cada zona del laberinto elevado en cruz.

12.7. Densidad celular

La **Figura 17**, presenta la media $\pm$ EE del número de núcleos marcados con DAPI en las microfotografías de regiones hipocámpales de ratas *Zucker Diabetic Fatty*, después de 4 semanas de tratamiento con extracto de *Prosthechea karwinskii* o su vehículo. Se observa que en la región de CA1 (ver **A**) la rata OZDF HG TX (negro, 488.1 ± 12.5) presenta un aumento significativo en su densidad celular al

compararse con el grupo LEAN VH (azul, 433 ± 6.9), al igual que, con el LEAN TX (442.3 ± 9.5).

En la región de CA3 (ver **B**) el grupo OZDF HG TX (negro, 521.6 ± 14.6) presenta un aumento significativo de la densidad neuronal al compararse con 2 grupos: el grupo LEAN TX (rojo, 455.8 ± 8.3) y el grupo OZDF NG TX (morado, 459.6 ± 12.45).

De la misma forma en la región de GD (ver **C**) el grupo OZDF HG TX (negro, 631.7 ± 21.1) exhibió un aumento significativo de la densidad neuronal al compararse con 4 grupos: el grupo LEAN VH (azul, 561.5 ± 11.7), el grupo LEAN TX (rojo, 560.3 ± 16.3), el grupo OZDF NG VH (verde, 550.2 ± 15.8) y el más destacable, su grupo control (OZDF HG VH, naranja, 551.2 ± 13.4).

Considerando estos resultados en su conjunto, se puede decir que el extracto de orquídea *Prosthechea karwinskii* produjo un incremento de la densidad neuronal en las ratas OZDF HG TX, especialmente en la región de GD.

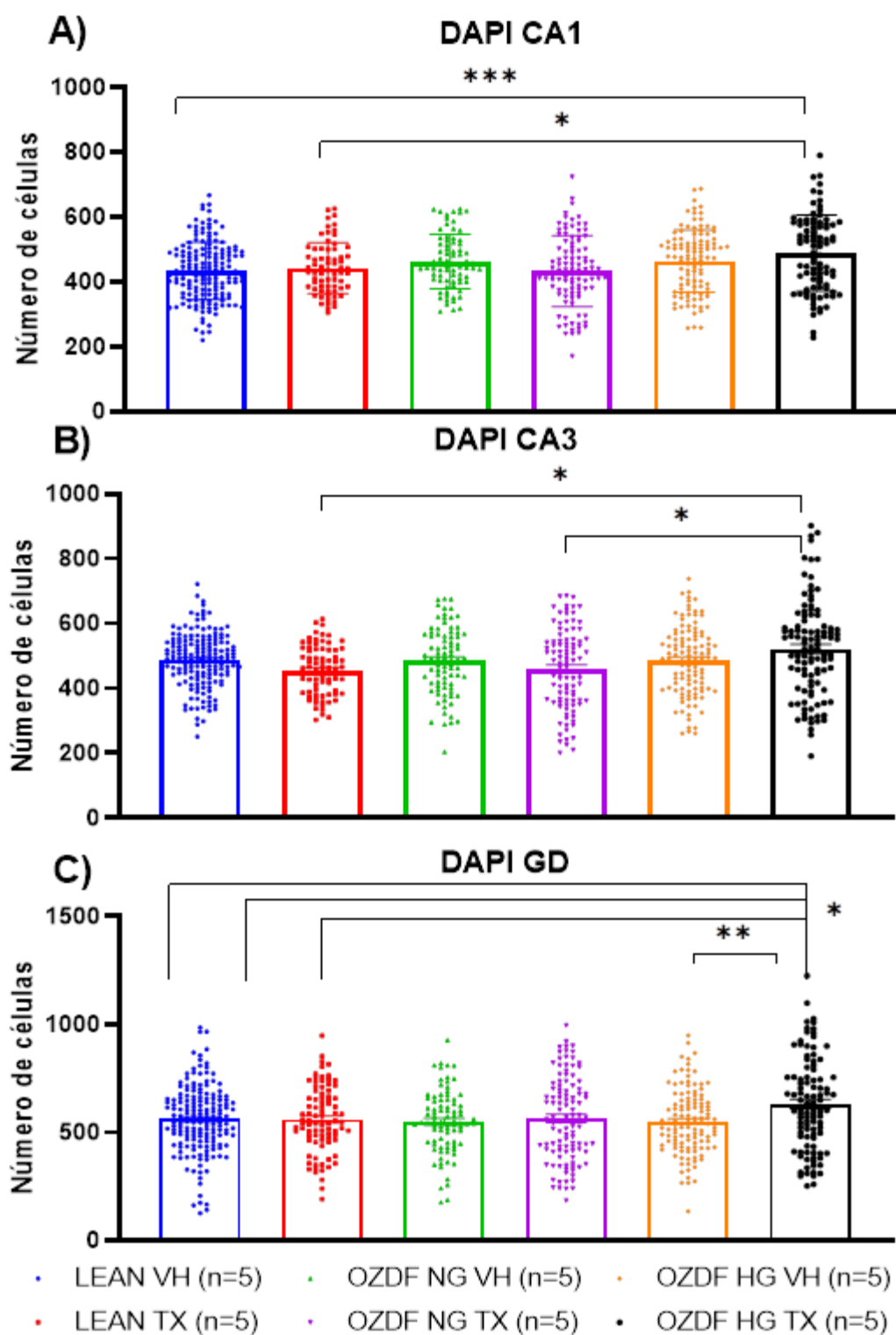


Figura 17. Densidad celular.

Media $\pm$ EE del número de núcleos marcados con DAPI en las microfotografías de regiones hipocámpales de ratas Zucker Diabetic Fatty, después de 4 semanas de tratamiento con extracto de *Prosthechea karwinskii*. A)

Densidad celular en CA1. B) Densidad celular en CA3. C) Densidad celular en GD. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$ (Prueba ANOVA de una vía).

12.8. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

Se muestra en la **Figura 19**, como la media $\pm$ EE, la cantidad de Regiones de interés (ROIs), obtenidas de manera semiautomática con el software *ImageJ Fiji*, que representan la concentración del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (ver sección de “Análisis de datos” en “Material y métodos”). En el panel **A**, se observa el número de ROIs que presenta cada grupo en la región hipocampal CA1. Se observa un aumento de BDNF en los 4 grupos de ratas obesas (OZDF NG VH, verde, 974.5 ± 65.8 ; OZDF NG TX, morado, 900.5 ± 38.1 ; OZDF HG VH, naranja, 829.6 ± 31.4 ; OZDF HG TX, negro, 1013 ± 37), con respecto a los grupos de ratas delgadas (LEAN VH, azul, 635.1 ± 38.8 ; LEAN TX, rojo, 630.8 ± 44.6). En adición se muestra un aumento significativo de la cantidad de BDNF en las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento (OZDF HG TX, negro) al compararlas con sus controles (OZDF HG VH, naranja).

El panel **B** presenta el número de ROIs en la región hipocampal CA3. Se observa un aumento de BDNF en los grupos OZDF NG VH (verde, 894.5 ± 54.5), OZDF NG TX (morado, 886 ± 61.5) y OZDF HG TX (negro, 974.6 ± 33.2), con respecto al grupo de delgado control (LEAN VH, azul, 665.9 ± 32.4). Al comparar a los grupos obesos con el grupo delgado tratamiento (LEAN TX, rojo, 789.8 ± 32.25), solo se muestra una diferencia significativa con el grupo OZDF HG TX, que tiene BDNF aumentado. Además, se muestra un aumento significativo de la cantidad de BDNF en las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento (OZDF HG TX, negro) al compararlas con sus controles (OZDF HG VH, naranja, 788.4 ± 34.2).

El panel **C**, muestra el número de ROIs en la región hipocampal GD. Se observa un aumento de BDNF en los grupos de ratas obesas OZDF NG VH (verde, 929.4 ± 65.8), OZDF NG TX (morado, 946.2 ± 55.3) y OZDF HG TX (negro, 893.6 ± 21.2), con respecto al grupo de delgado control (LEAN VH, azul, 699.5 ± 37.2). Así mismo, se puede ver que el grupo OZDF HG VH (naranja, 729.9 ± 27.6) presenta

niveles significativamente menores que los grupos obesos normoglucémico (OZDF NG VH, verde; OZDF NG TX, morado), y una tendencia similar al ser comparado con su grupo tratamiento (OZDF HG TX, negro), sin que llegue a ser un resultado significativo.

Estos resultados, en conjunto, parecen indicar que en este estudio la obesidad tiene un papel crucial en las concentraciones de BDNF de ratas *Zucker Diabetic Fatty*, ya que en ratas obesas se encuentra aumentado en comparación al grupo delgado, después de 4 semanas de administración del extracto de hojas *Prosthechea karwinskii* (TX), así como que el tratamiento parece tener un efecto dependiente del nivel de glucosa, por lo cual aumentó los niveles de BDNF de las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento (OZDF HG TX), comparadas con su control (OZDF HG VH).

Adicionalmente en la **Figura 18** se muestra una imagen representativa de cómo se visualizó la marca anti-BDNF en las microfotografías

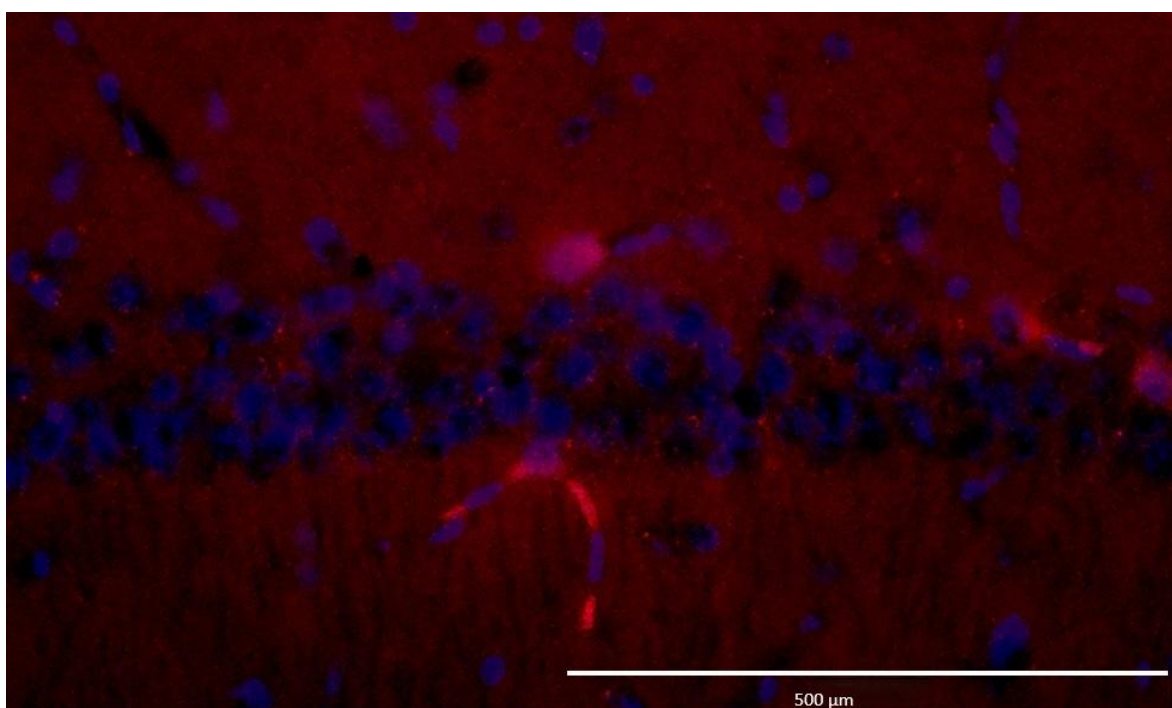


Figura 18. Imagen representativa de microfotografía con marca anti-BDNF

En azul se observan los núcleos de las células marcadas con DAPI, los puntos rojos de mayor intensidad son la marca anti-BDNF.

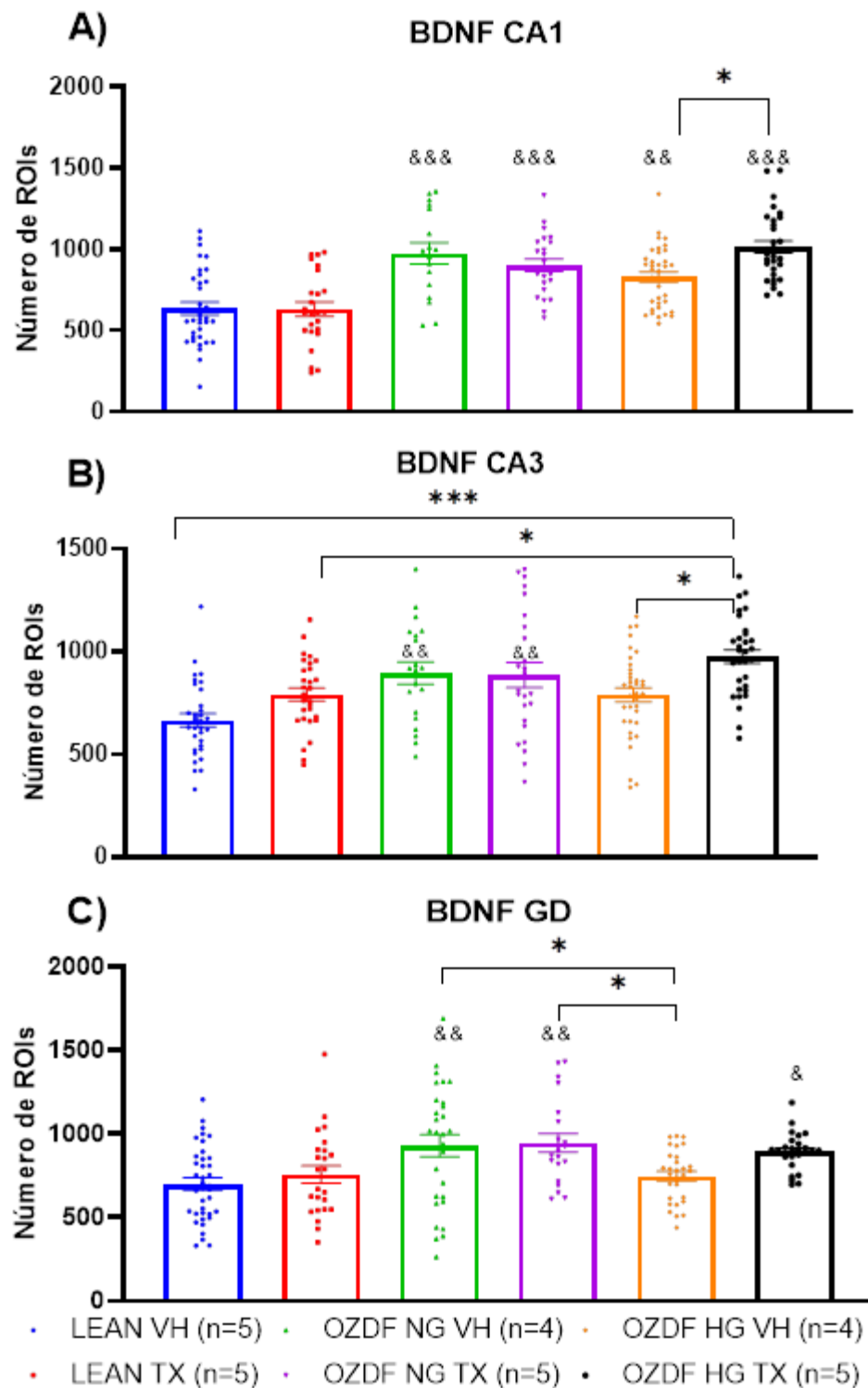


Figura 19. Expresión de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

Media $\pm$ EE del número de ROIs para la marca de BDNF en las regiones hipocámpales de ratas Zucker Diabetic Fatty tras 4 semanas de tratamiento con el extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii*. A) BDNF en CA1. B) BDNF en CA3. C) BDNF en GD. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$. & $p \leq 0.05$ vs LEAN VH; && $p \leq 0.005$ vs LEAN VH; &&& $p \leq 0.0005$ vs LEAN VH (Prueba ANOVA de una vía).

12.9. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

La **Figura 20** representa, como la media $\pm$ EE, la cantidad de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP. En el panel **A**, se observa el número de astrocitos marcados que presenta cada grupo en la región hipocampal CA1, con una disminución significativa de estos por parte de las ratas OZDF HG TX (negro, 57.9 ± 2.7), al ser comparadas con el grupo LEAN VH (azul, 76.46 ± 2.8); así mismo, tendencias similares se observan al comprar al grupo OZDF HG TX con el grupo OZDF NG VH (verde, 70.9 ± 2.9) y con el grupo OZDF NG TX (morado, 68.45 ± 2.2), sin embargo estos no llegaron a ser significativos.

En el panel **B**, se muestra el número de astrocitos marcados en la región hipocampal CA3, nuevamente las ratas OZDF HG TX (negro, 52.9 ± 2.6) presentan una disminución significativa, del número de astrocitos marcados, al ser comparadas con los siguientes grupos: LEAN VH (azul, 76.7 ± 2.6), LEAN TX (rojo, 67.35 ± 4.0), OZDF NG VH (verde, 72.9 ± 2.8) y su grupo control (OZDF HG VH, naranja, 69.6 ± 2.4). Además, el grupo OZDF NG TX (morado, 62.2 ± 2.4) también presentó una disminución significativa, en el número de astrocitos marcados, al ser comparado con el grupo LEAN VH (azul), así como, una tendencia similar al ser comprado con su grupo control (OZDF NG VH, naranja, $p=0.09$), sin lograr significancia estadística.

El número de astrocitos marcados en la región hipocampal GD se muestra en el panel **C**, de nuevo las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento (OZDF HGT TX, negro, 56.5 ± 3.1) presentan una disminución significativa, del número de astrocitos marcados, al ser comparadas con los siguientes grupos: LEAN VH (azul, 80.88 ± 3.0), LEAN TX (rojo, 76.6 ± 3.9), OZDF NG VH (verde, 82 ± 2.5), OZDF NG TX (morado, 69.6 ± 1.9), así como, su grupo control (OZDF HG VH, naranja, 69.6 ± 2.4). Además, el grupo obeso normoglucémico tratamiento (OZDF NG TX, morado) también presentó una disminución significativa, en el número de astrocitos marcados, al ser comparado con el grupo LEAN VH (azul) y una tendencia similar

al ser comparado con su grupo control (OZDF NG VH, verde, $p=0.09$), sin lograr significancia estadística.

En conjunto estos resultados sugieren que, en el fenotipo Obeso y con hiperglucemia, la administración del extracto de *Prosthechea karwinskii*, disminuye la cantidad de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en las regiones hipocampales CA1, CA3 y GD, mientras que en el fenotipo Obeso y con niveles de glucosa normal, la administración del extracto de *Prosthechea karwinskii*, disminuye la cantidad de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en las regiones hipocampales CA3 y GD.

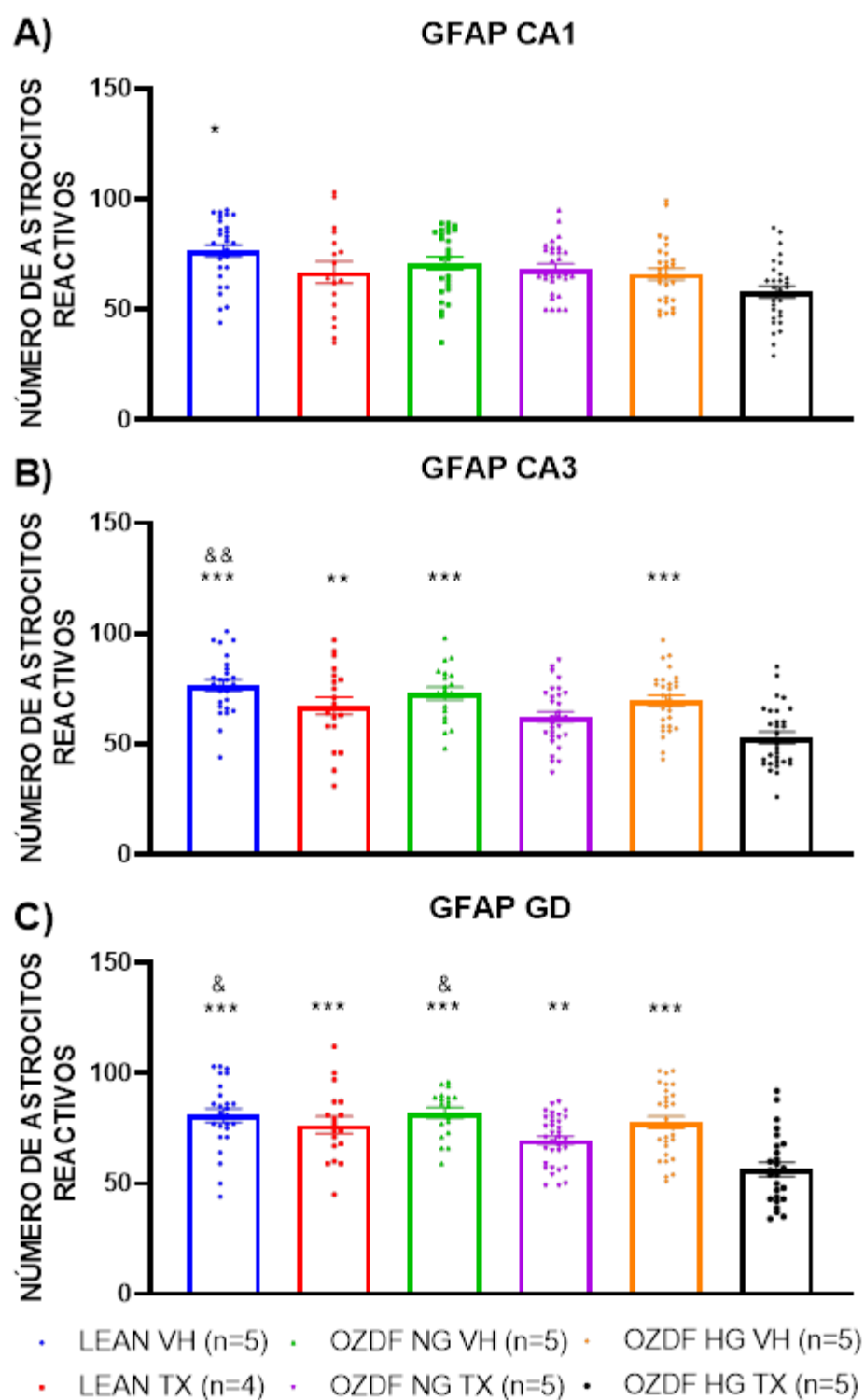


Figura 20. Astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP

Media $\pm$ EE del número de astrocitos marcados, en las regiones hipocámpales CA1, CA3 y GD, de las ratas Zucker Diabetic Fatty después de 4 semanas de tratamiento con el extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii*.

A) Número de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en CA1. B) Número de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en CA3. C) Número de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en GD. * $p \leq 0.05$ vs OZDF HG TX; ** $p \leq 0.005$ vs OZDF HG TX; *** $p \leq 0.0005$ vs OZDF HG TX; & $p \leq 0.05$ vs OZDF NG TX; && $p \leq 0.005$ vs OZDF NG TX (Prueba ANOVA de una vía).

De manera complementaria, en la **Figura 21** y **Figura 22**, se presentan imágenes representativas de las microfotografías de las regiones hipocampales CA1, CA3 y GD, de ratas *Zucker Diabetic Fatty*, donde las muestras (cortes de cerebro) fueron procesadas con inmunofluorescencia para GFAP. A pesar de que este estudio no se enfocó en evaluar la morfología de los astrocitos, en las microfotografías se puede visualizar la presencia de astrocitos en diferentes tamaños y con grosores diferentes en sus proyecciones (imágenes también disponibles en la sección **Anexo 2**).

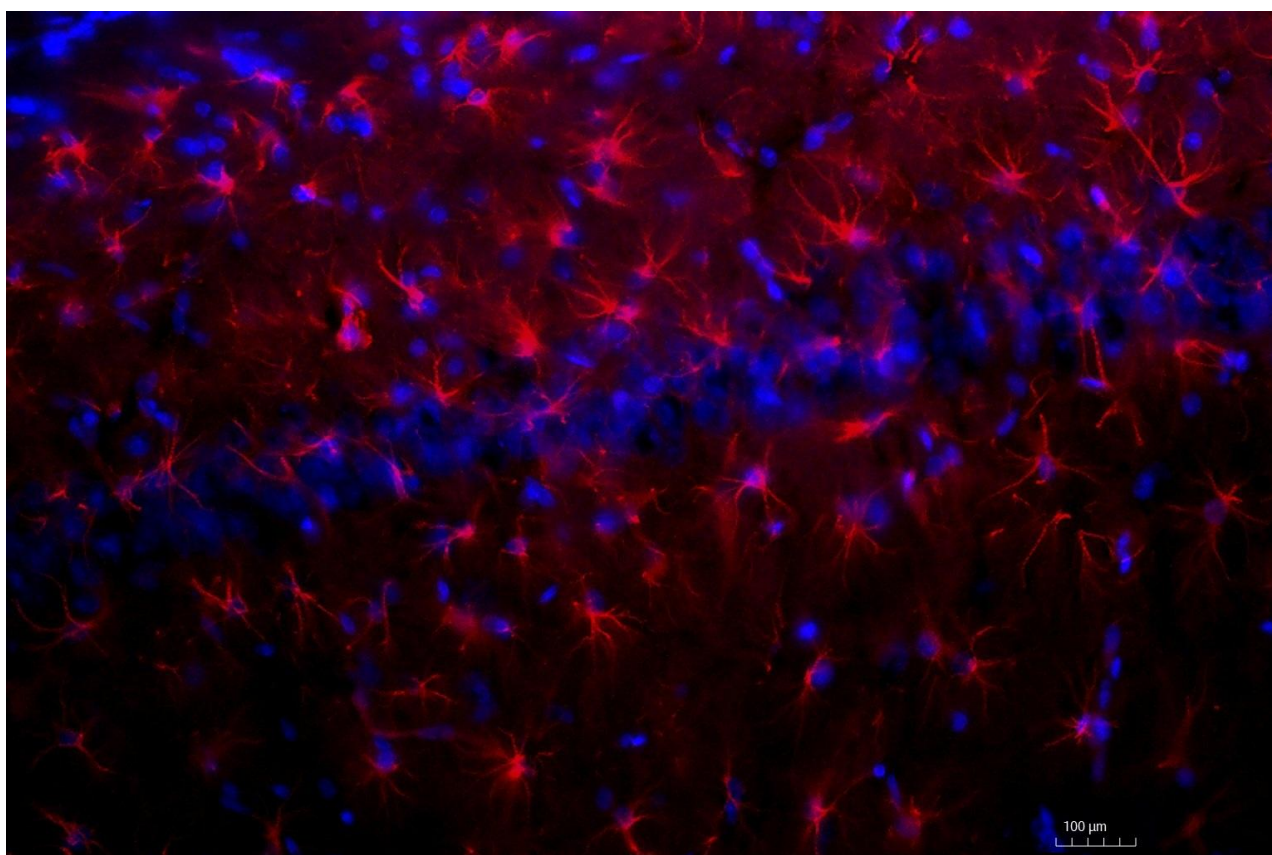


Figura 21. Imagen representativa de inmunofluorescencia para GFAP

En azul se observan los núcleos de las células marcadas con DAPI, los astrocitos reactivos marcados con anticuerpo anti-GFAP se observan en rojo debido a la unión de Rodamina como anticuerpo secundario

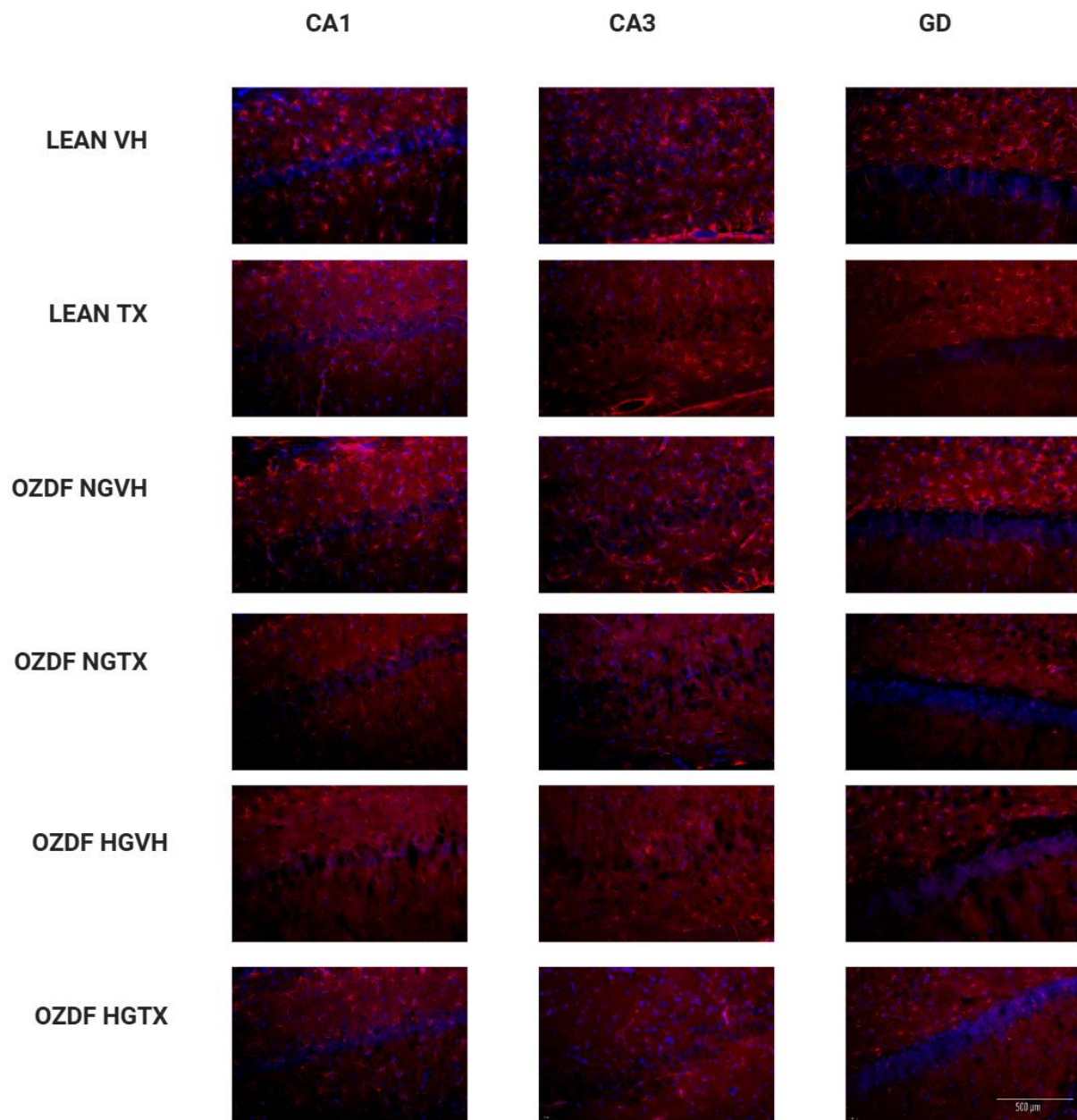


Figura 22. Microfotografías de regiones hipocampales CA1, CA3 y GD con marca anti-GFAP.
 Procesadas con inmunofluorescencia para GFAP, de ratas Zucker Diabetic Fatty, después de 4 semanas de tratamiento con extracto de *Prosthechea karwinskii*.

12.10. Sinaptofisina (SYP)

En la **Figura 24** se puede observar de forma indirecta, a través del número de ROIs (ver sección de “Análisis de datos” en “Material y métodos”), la cantidad de sinaptofisina (SYP) presente en las regiones hipocampales CA1 (ver panel **A**), CA3 (ver panel **B**) y GD (ver panel **C**), de ratas *Zucker Diabetic Fatty*, después de 4 semanas de tratamiento. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos.

También en la **Figura 23** se puede visualizar una imagen representativa de cómo se observó el marcaje anti-SYP en las microfotografías.

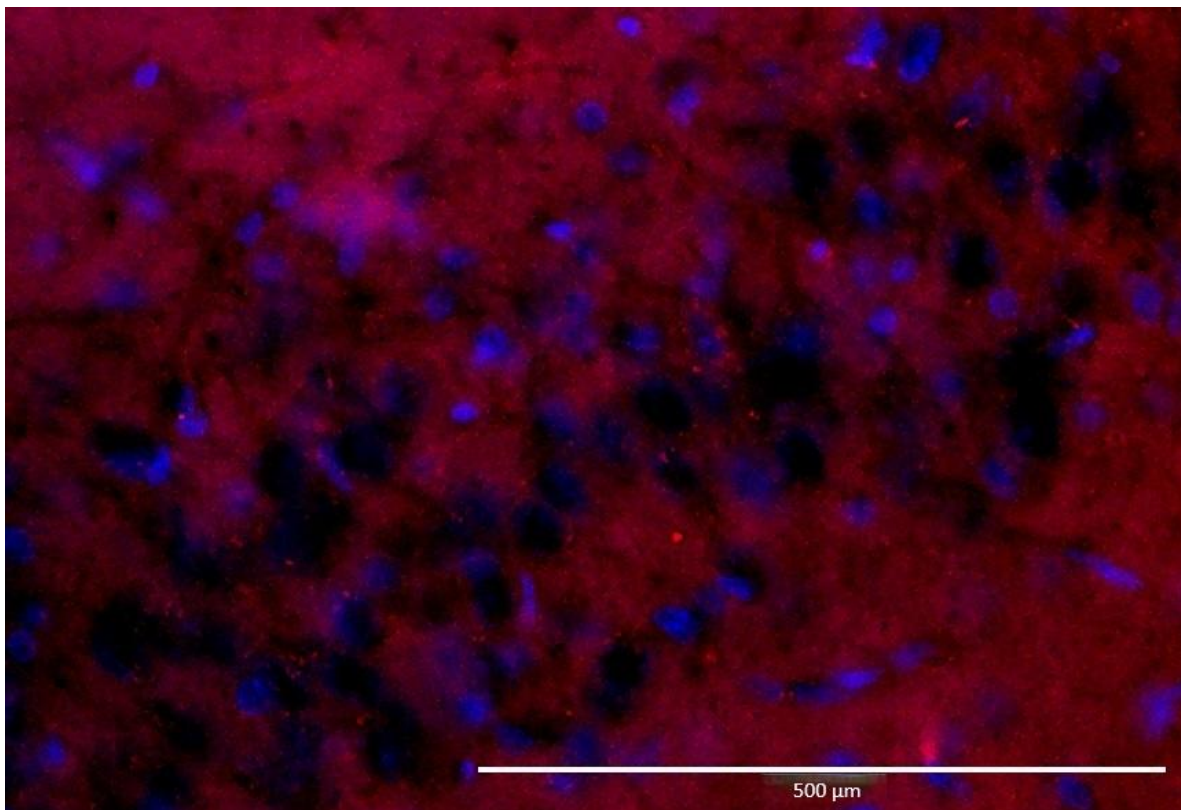


Figura 23. Imagen representativa de microfotografía con marcaje anti-SYP

En azul se observan los núcleos de las células marcadas con DAPI, la marca anti-syp se observa como un puntillero rojo.

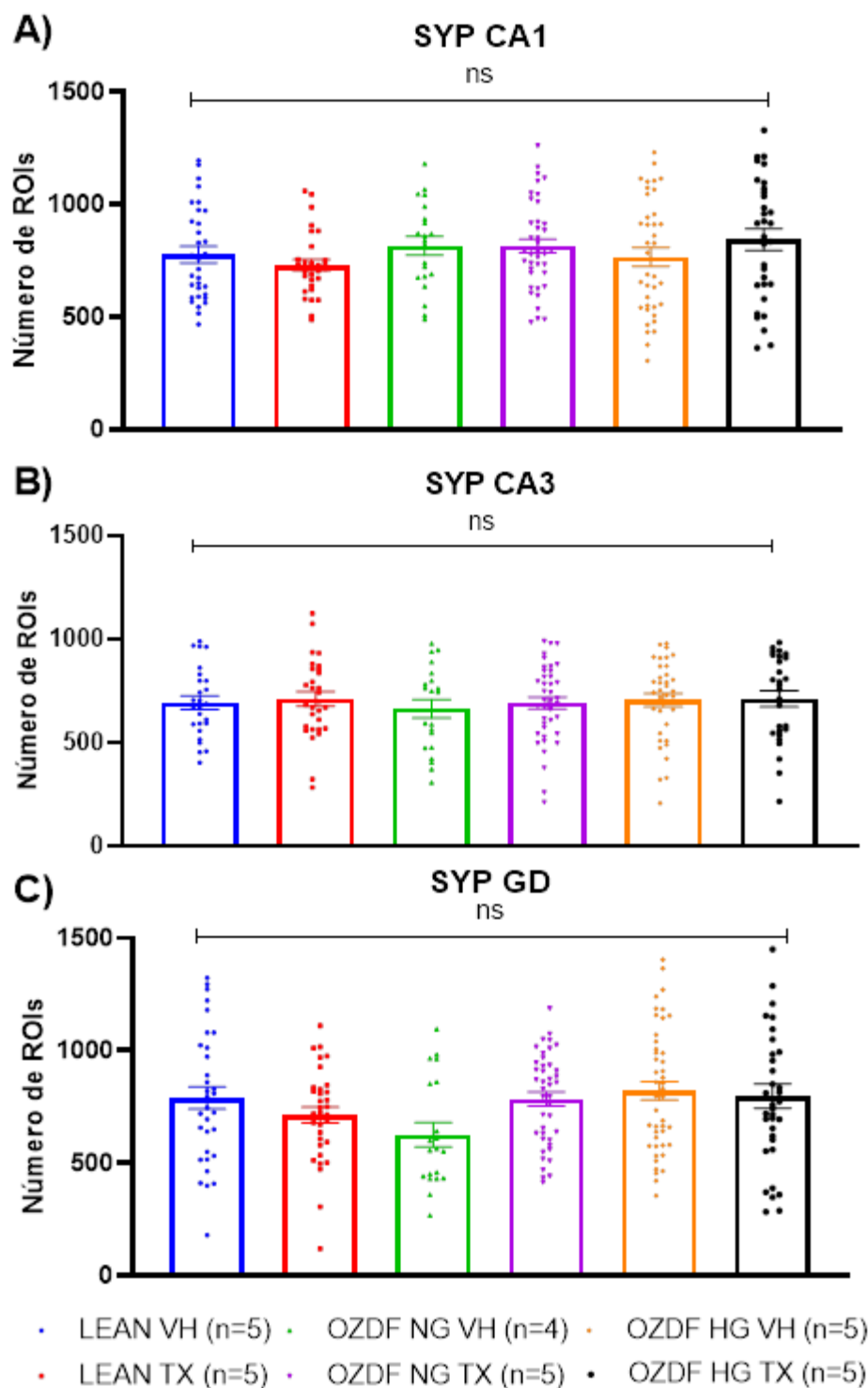


Figura 24. Expresión de sinaptofisina (SYP)

Media $\pm$ EE del número de ROIs para la marca de SYP en las regiones hipocampales de ratas Zucker Diabetic Fatty, después de 4 semanas de tratamiento con el extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii*. A) SYP en CA1. B) SYP en CA3. C) SYP en GD. ns, diferencias no significativas (prueba ANOVA de una vía).

12.11. Perfil lipídico

En la **Figura 25** se muestran, como la media $\pm$ EE, los resultados del perfil lipídico de las ratas *Zucker Diabetic Fatty*, después de 4 semana de tratamiento con el extracto de *Prosthechea karwinskii*.

En primer lugar se evaluó el colesterol sérico (ver panel **A**) donde, como era esperado, los grupos obesos (OZDF NG VH, verde, 162.9 ± 9.3 ; OZDF NG TX, morado, 140.2 ± 8.4 ; OZDF HG VH, naranja, 172.9 ± 20.2 ; OZDF HG TX 155.7 ± 12.9) presentaron niveles significativamente mayores que los grupos delgados (LEAN VH, azul, 82.10 ± 4.2 ; LEAN TX, rojo, 80.59 ± 5.0), como se observa, a pesar de que los grupos tratamiento presentan valores menores que su respectivo control no llegan a ser diferencias significativas.

En cuanto a los triglicéridos séricos (ver panel **B**), también se observa que los grupos obesos tienen niveles significativamente mayores que los grupos delgados (LEAN VH, azul, 33.45 ± 2.4 ; LEAN TX, rojo, 30.6 ± 2.4), sin embargo, en esta ocasión se puede apreciar que el tratamiento provocó la disminución de la concentración de triglicéridos séricos en las ratas OZDF HG TX (negro, 101.9 ± 6.5) al ser comparadas con su grupo control (OZDF HG VH, naranja, 155.9 ± 19.3). Por otro lado, a pesar de que es visible que el grupo OZDF NG TX (morado, 129.9 ± 21.8) presenta niveles disminuidos de triglicéridos, esto no llega a la significancia estadística al compararse con su grupo control (OZDF NG VH, verde, 163.9 ± 6.9).

En el panel **C** se muestra el nivel de colesterol de alta densidad (HDL, comúnmente llamado “colesterol bueno”), donde nuevamente se aprecia que los grupos obesos (OZDF NG VH, verde, 60.2 ± 5.5 ; OZDF NG TX, morado, 78 ± 3.3 ; OZDF NH VH, negro, 82.2 ± 3.1 ; OZDF HG TX, negro, 82.3 ± 5) presentaron niveles significativamente mayores que los grupos delgados (LEAN VH, azul, 35.4 ± 2.8 ; LEAN TX, rojo, 42 ± 1.6).

Por otra parte, en el panel **D**, se presentan los niveles de colesterol de baja densidad (LDL, comúnmente llamado “colesterol malo”), los cuales se muestran

disminuidos en el grupo OZDF NG TX (morado, 40.8 ± 12.8) al compararse con su grupo control (OZDF NG VH, verde, 90.2 ± 7.2). La misma tendencia se observa al comparar al grupo OZDF HG TX (negro, 61.55 ± 8.7) con su grupo control (OZDF HG TX, naranja, 98.6 ± 8.8), que con una $p = 0.06$ no llega a ser significativa. Igualmente, los grupos delgados (LEAN VH, azul, 48.1 ± 8 ; LEAN TX, rojo, 28.3 ± 3.7) presentan niveles significativamente menores que los grupos obesos control (OZDF NG VH, verde; OZDF HG VH, naranja), pero no que los grupos obesos tratamiento (OZDF NG TX, morado; OZDF HG TX, negro).

Así mismo, según el panel **E**, al evaluar los niveles de colesterol de muy baja densidad (VLDL) también se observa que los grupos obesos tienen niveles significativamente mayores que los grupos delgados (LEAN VH, azul, 4.7 ± 0.3 ; LEAN TX, rojo, 4 ± 0.3), sin embargo, estos niveles de VLDL son significativamente menores en el grupo OZDF NG TX (morado, 17.2 ± 2.5) que en su grupo control (OZDF NG VH, verde, 26 ± 0.7), así como, son significativamente menores en el grupo OZDF HG TX (negro, 14.9 ± 1.2) que en su grupo control (OZDF HG VH, naranja, 20.9 ± 0.4).

Finalmente, en el panel **F**, se observa el índice triglicéridos (TG)/ colesterol de alta densidad (HDL-c), el cual es un cociente lipoproteico utilizado como predictor de resistencia a la insulina, Diabetes tipo 2, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular (Han et al., 2025; Kosmas et al., 2023; Yuge et al., 2023). En estos resultados se puede apreciar que nuevamente los grupos delgados (LEAN VH, azul, 0.9 ± 0.01 ; LEAN TX, rojo, 0.7 ± 0.04) presentan los valores más bajos, siendo significativamente menores que los grupos OZDF NG VH (verde, 3.1 ± 0.3), OZDF NG TX (morado, 1.6 ± 0.3) y OZDF HG VH (naranja, 1.9 ± 0.3). Además, se puede observar que el tratamiento provoco una disminución significativa de este índice en el grupo OZDF NG TX (morado) al comparase con su grupo control (OZDF NG, verde). A pesar de que los otros dos grupos tratamiento presentan valores inferiores, en este índice, en comparación con sus respectivos grupos control, esto no es estadísticamente significativo.

≤ 0.0005 vs LEAN VH; $\#p \leq 0.05$ vs LEAN TX; $\#\#p \leq 0.005$ vs LEAN TX; $\#\#\#p \leq 0.0005$ vs LEAN TX; $\&\&p \leq 0.005$ vs ambos grupos LEAN; $\&\&\&p \leq 0.0005$ vs ambos grupos LEAN (Pruebas ANOVA de una vía).

13. Discusión

En el presente trabajo, se investigó por primera vez el efecto de la administración del extracto de hojas de *Prosthechea Karwinskii* en ratas *Zucker Diabetic Fatty*, una cepa que se utiliza ampliamente para el estudio de la obesidad y la Diabetes. La dosis del extracto de hojas de *Prosthechea Karwinskii*, utilizada en esta tesis, fue de 300 mg/ kg de peso, una dosis tomada de referencias previas donde en ratas Wistar con síndrome metabólico se realizaron pruebas a diferentes dosis (Barragán-Zarate et al., 2021). Además, por primera vez se caracterizaron los niveles de BDNF, GFAP y SYP en el hipocampo de este modelo, a continuación, se discutirán los resultados de este trabajo en cuatro aspectos:

1. Caracterización del biomodelo y el efecto del tratamiento en el aumento de peso y tolerancia a la glucosa.
2. Efecto del tratamiento en la conducta
3. Efecto del tratamiento en el hipocampo (número de células, BDNF, GFAP y SYP)
4. Efecto del tratamiento en el perfil lipídico

13.1. Caracterización del biomodelo y el efecto del tratamiento en el aumento de peso y tolerancia a la glucosa

En este trabajo se utilizó la rata *Zucker Diabetic Fatty*, un biomodelo de obesidad y Diabetes. Para su caracterización se evaluaron diferentes parámetros morfométricos y como se mostró en la **Tabla 4**, la mayoría de estos parámetros (peso corporal, longitud nasoanal, circunferencia abdominal, IMC y grasa epididimal y retroperitoneal) aumentaron significativamente en las ratas obesas (OZDF) en comparación con el grupo delgado (LEAN). Estos resultados confirman que las ratas OZDF presentan obesidad entre las 12 y 17 semanas de edad (el tiempo que duro el tratamiento), lo que concuerda con los datos reportados previamente por otros

grupos de investigación (Berra-Romani et al., 2019; Moreno-Salgado et al., 2023; Wang et al., 2013).

La prueba de tolerancia a la glucosa constituye uno de los criterios que según la Asociación Americana de Diabetes (ADA), son suficientes para diagnosticar DT2 en humanos (American Diabetes Association, 2026). A pesar de que en la mayoría de la literatura se reportan únicamente dos grupos (fenotipos) en los que se puede dividir la cepa *Zucker Diabetic Fatty*, los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa en conjunto con los parámetros morfométricos, permitieron que, en este estudio, se dividiera a la cepa en 3 grupos, el grupo delgado que presenta niveles de glucosa normales (LEAN), el grupo obeso que también tiene niveles de glucosa normales (OZDF NG) y el grupo que es obeso y presenta niveles de glucosa elevados que llevarían al diagnóstico de Diabetes según la ADA (OZDF HG).

El artículo de Wang y colaboradores, del 2014, es un precedente de esta división del grupo obeso en normoglucémico e hiperglucémico, donde apuntan que las ratas normoglucémicas OZDF parecen regresar a un fenotipo muy similar al de las ratas *Zucker* obesas no diabéticas de las que derivaron (Wang et al., 2014), lo cual puede ser una excelente explicación para la existencia del grupo OZDF NG, que a pesar de que es igual genéticamente (ambos grupos obesos son hermanos, y presentan la mutación *fa / fa* que los hace obesos) y ambientalmente al otro grupo obeso, muestran diferentes manifestaciones de la enfermedad.

Por otro lado, en la **Tabla 4** de los parámetros morfométricos, se puede observar que no hay diferencias entre los grupos control y tratamiento. Esto es contrario a lo que Barragán y colaboradores (2021) reportaron, en ratas Wistar con síndrome metabólico, donde el extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* (*P. karwinskii*), a una dosis de 300mg/kg de peso del animal (misma dosis que en este trabajo), tiene un efecto antiobesidad, al disminuir los depósitos de grasa abdominal y pericárdica. Esta diferencia puede deberse al modelo animal utilizado, ya que en ratas OZDF no se ha reportado disminución del peso, solo atenuación del aumento de peso (Tekwe et al., 2013). Con base en esto se procedió a buscar otra forma de evaluar el efecto del extracto de hojas de *P. karwinskii* sobre el aumento de peso en

ratas OZDF, así, se monitoreó el peso de las ratas por 4 semanas (antes, durante y después del tratamiento) y se determinó el porcentaje de aumento de peso mediante la siguiente ecuación (Salleh et al., 2022; Wachal et al., 2020):

$$\text{Aumento de peso (\%)} = \frac{\text{peso} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Donde “peso” se sustituye por el peso de la rata en cada semana y “peso inicial” es el peso de la rata previo a la primera curva de tolerancia a la glucosa. El hallazgo más notable al comparar el porcentaje de aumento de peso es el de la semana 4 (**Figura 11**), donde se observan diferencias significativas entre los grupos LEAN y OZDF (algo esperado como se mencionó anteriormente), pero también entre el grupo OZDF NG VH y el grupo OZDF NG TX que demuestra que el extracto de hojas de *P. karwinskii*, a una dosis de 300mg/kg de peso del animal, tiene un efecto antiobesidad en ratas OZDF, pero únicamente en el caso de las Normoglucémicas. Este resultado puede deberse a los compuestos presentes en el extracto, como la embelina que inhibe la adipogénesis y la lipogénesis (Gao et al., 2017), además es comparable con el mismo trabajo de Barragán y col. (2021), donde el extracto de hojas de *P. karwinskii* tiene efecto antiobesidad al disminuir el aumento de peso.

Como se describió anteriormente la insulina desempeña un papel crucial en la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo, realizar una curva de tolerancia, no solo es un criterio de diagnóstico de Diabetes, sino una parte central en el estudio de la fisiopatología de esta enfermedad, si bien la mayoría de los receptores de insulina se encuentran en los tejidos diana periféricos, también se ha informado sobre su alta densidad celular en el cerebro, principalmente en las áreas responsables de la regulación del apetito, la actividad autónoma y la función cognitiva (Blázquez et al., 2014; Maciejczyk et al., 2019).

En la curva de tolerancia a la glucosa postratamiento (**Figura 12**) los grupos LEAN y OZDF NG tienen niveles similares de glucosa en sangre y logran llegar a un valor menor a 200 mg/dl de glucosa, lo que indica que el grupo obeso

normoglucémico no presentó el desarrollo de la Diabetes, y que la división en grupos no fue un error metodológico (Wang et al., 2014).

Para la comparación de las curvas de tolerancia a la glucosa pre y postratamiento, el manejo de los datos presentaba complicaciones para su interpretación, ya que las morfologías son distintas y las diferencias significativas debían explicarse para los 4 puntos de la prueba (30, 60, 90, 120 minutos), así que, se optó por evaluar el área bajo la curva (ABC), que es un valor geométrico, que refleja la variación completa de la glucosa en sangre durante toda la prueba, y la cual puede ser útil como índice de tolerancia a la glucosa y como un parámetro para evaluar la eficacia de un tratamiento (Liu et al., 2022; Sakaguchi et al., 2016). El ABC de la curva de tolerancia a la glucosa pretratamiento muestra diferencias significativas entre las ratas normoglucémicas (LEAN y OZDF NG) y las ratas OZDF HG. Por otro lado la comparación del ABC de la curva de tolerancia a la glucosa postratamiento y pretratamiento, solo obtuvo diferencia significativa entre los en el grupo OZDF HG TX, esto puede interpretarse como que el extracto de hojas de *P. karwinskii* (300 mg/ kg) tiene un efecto sobre el nivel de glucemia, exclusivamente para ratas que presentan hiperglucemia, lo cual respalda sus efectos hipoglucemiantes en ratas Wistar con síndrome metabólico (Barragán-Zarate et al., 2021). Este resultado puede deberse a que el extracto de hojas de *P. karwinskii* contiene ácido quínico que favorece la secreción de insulina y a una mejor tolerancia a la glucosa (Heikkilä et al., 2019), rutina que aumenta de la captación tisular de glucosa, (Ghorbani, 2017), embelina que redujo los niveles de glucosa en ratones con una dieta rica en grasas (Gao et al., 2017) y ácido clorogénico que en pacientes con intolerancia a la glucosa disminuyó la glucosa plasmática en ayunas y aumentó la sensibilidad a la insulina (Zuñiga et al., 2018). Además de ser el resultado esperado en esta investigación, convierte al extracto de hojas de *P. karwinskii* en un tratamiento deseable, ya que en la actualidad un problema relacionado con el tratamiento hipoglucemiante, en la Diabetes, es la inducción de hipoglucemias que pueden ser peligrosas o incluso mortales (Ascaso, 2014), por lo que este efecto selectivo plantea buenas expectativas para el futuro de este tratamiento.

13.2. Efecto del tratamiento en la conducta

Se realizaron 3 pruebas de conducta como se indicó en los apartados anteriores, en la primera prueba, campo abierto, se evaluó actividad motora y conductas asociadas a la ansiedad; en la segunda prueba, prueba de reconocimiento del objeto novedoso, se evalúa la memoria; finalmente en la tercera prueba, laberinto elevado en cruz, se evaluó ansiedad.

En cuanto a la distancia total recorrida (**Figura 13 A**) durante la prueba de campo abierto, no hubo diferencias significativas entre los grupos tratamientos y control, ni entre los fenotipos, únicamente se puede observar que todos los grupos de ratas obesas presentan valores menores que los de ratas delgadas. Datos en proceso de publicación, del laboratorio de neuroplasticidad y metabolismo, sí presentan diferencias significativas entre los grupos delgados y obesos de la misma manera que proponen otros autores en otros estudios con rata diabéticas (Sadikan et al., 2021; Spoelder et al., 2023). La diferencia puede recaer en la edad, dado que por las 4 semanas de tratamiento, las ratas del presente estudio son mayores, así como en el uso de la vía oral con una cánula gástrica que pudo estresar a los animales (Taylor et al., 2025). Por otro lado, este resultado también podría indicar que, a pesar de la obesidad, las ratas empleadas en esta investigación no presentan diferencias significativas en su capacidad locomotora, lo cual asegura que para otras mediciones o pruebas, las diferencias entre los grupos son debidas a la administración del extracto de la *P. Karwinskii* o a la obesidad e hiperglucemia, y no a que sus capacidades motrices estén deterioradas (Tekwe et al., 2013). Adicionalmente la prueba además de evaluar motricidad también evalúa la capacidad de exploración de los animales ante un ambiente novedoso (Võikar & Stanford, 2023), al no encontrar cambios significativos se puede pensar en que las condiciones experimentales fueron homogéneas y que el comportamiento de exploración de los animales es similar.

A pesar de que las ratas recorren distancias similares, los grupos presentan diferentes velocidades **Figura 13 B**, al comparar a los grupos control con sus respectivos tratamientos no se puede ver una tendencia definida. Por un lado,

tenemos que, en el grupo obeso hiperglucémico, el tratamiento tuvo mayor velocidad que el control, y por otro lado tenemos al grupo obeso normoglucémico, en el que sucede lo contrario, el grupo OZDF NG TX fue el más lento de todos los grupos. Esto podría indicar un efecto dual del extracto de hojas de *P. karwinskii* en la velocidad que puede ser un indicador de ansiedad, sin embargo, resultados posteriores no se ve la misma tendencia.

Así, otro parámetro evaluado fue el porcentaje de tiempo móvil (**Figura 14 A**), este grafico no mostró tendencias concluyentes, ya que el único resultado significativo fue la disminución del tiempo móvil de la rata OZDF HG TX al compararse con el grupo delgado control, lo mismo sucede en la tigmotaxis (**Figura 14B**) que no presenta diferencias significativas entre los grupos. Bajo este mismo enfoque, los resultados de la prueba de laberinto elevado en cruz (**Figura 16**), una prueba que no se había realizado antes en este modelo experimental, tampoco muestran diferencias significativas, por lo que se puede decir que los resultados no tienen la solidez suficiente como para decir que el extracto tuvo un efecto, ya sea ansiolítico o ansiogenico, ni tampoco la obesidad o la Diabetes.

La Diabetes causa déficits funcionales y estructurales en el cerebro, reportando cambios estructurales en el hipocampo, que por su función en la memoria traen como consecuencia el deterioro cognitivo (Sato & Morishita, 2014).de esta manera, para evaluar a la memoria de reconocimiento, se realizó la prueba reconocimiento de objeto novedoso, en esta se observó que las ratas OZDF HG TX presentan un índice de reconocimiento (IR) que va en aumento, mientras que su grupo control OZDF HG VH presenta un IR que va en decremento (**Figura 15 A**); así mismo, en la fase de memoria a largo plazo, la rata OZDF HG TX presenta una diferencia significativa en su IR al ser comparada con su grupo control OZDF HG VH, lo que sugiere que la administración del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* tuvo efecto sobre la memoria de reconocimiento en ratas OZDF hiperglucémicas, es decir mejoró su memoria, esto puede deberse a su efecto hipoglucémico y antioxidante, ya reportado en otros trabajos (Barragán-Zarate et al., 2021; Barragan-Zarate et al., 2022; Barragán-Zarate et al., 2020).

13.3. Efecto del tratamiento en el hipocampo (número de células, BDNF, GFAP y SYP)

La mejora en la cognición por parte de las ratas OZDF HG TX, que fue observada en la prueba de Reconocimiento de objeto novedoso, debía ser comprobada en el tejido cerebral, de esta forma se realizaron diferentes pruebas de inmunofluorescencia que permitieron evaluar el estado del hipocampo.

13.3.1. Densidad celular

En primer lugar, está la densidad celular (**Figura 17**) que se evaluó mediante el uso de DAPI. Se observa que en la región de CA1 la rata OZDF HG TX presenta un aumento significativo en el número de sus células al compararse con los grupos delgados. En la región de CA3 también el grupo OZDF HG TX tiene un aumento significativo al compararse con el grupo LEAN TX y el grupo OZDF NG TX. Así mismo en GD el grupo OZDF HG TX exhibió un aumento significativo al compararse con los grupos LEAN VH, LEAN TX, OZDF NG VH y, el más destacable, su grupo control (OZDF HG VH). Considerando estos resultados, se puede decir que el extracto de orquídea *Prosthechea karwinskii* produjo un incremento de la densidad neuronal en las ratas OZDF HG TX, especialmente en la región de GD.

La posible explicación para este resultado está en la neurogénesis, que es el proceso complejo a través del cual las células madre neurales se diferencian en neuronas y se integran en redes neuronales ya existentes, esta se produce principalmente en dos nichos neurogénicos, la zona subgranular del giro dentado y la zona subventricular de los ventrículos laterales (Sato & Morishita, 2014). Como se mencionó anteriormente el cerebro es propenso al estrés oxidativo y se ha asociado a la hiperglucemia crónica con el daño oxidativo de diferentes regiones cerebrales (McNeilly et al., 2023), en este contexto las ratas hiperglucémicas y con obesidad presentan una condicionante inflamatoria periférica que debería tener repercusiones sobre la neuroinflamación y el estrés oxidativo en el cerebro, y por los datos obtenidos en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso se puede

suponer que las ratas OZDF hiperglucémicas control presentan una afectación a las neuronas del hipocampo que están relacionadas a la memoria. En el hipocampo el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), aumenta la actividad del factor de transcripción factor nuclear Nrf2 que luego inhibe la vía de señalización Notch que favorece la autorrenovación, resultando un agotamiento de la neurogénesis (Landry & Huang, 2021). De esta manera el extracto de hojas de *P. karwinskii* podría revertir estos daños. Por un lado, el extracto en las ratas OZDF HG TX está teniendo efecto en los niveles de glucosa, lo que puede mejorar su estado metabólico al disminuir la formación de productos finales de glicación avanzada, lo que también mejoraría la inflamación y el estrés oxidativo; y por otro lado, el extracto de hojas de *P. karwinskii* posee compuestos como el kaempferol-3-O-rutinósido, que se puede absorber en el intestino, tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y que tiene efectos neuroprotectores reportados, relacionados con la estabilización de la membrana mitocondrial, la disminución de las especies reactivas de oxígeno y la inflamación neuronal al inhibir la activación del factor de transcripción factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Ma et al., 2017), así mismo el extracto también posee ácido quínico, del que se ha reportado que su administración suprimió la expresión de mediadores proinflamatorios y el marcador de estrés oxidativo en el hipocampo inyectado con lipopolisacárido (Park et al., 2024), rutina que protege la pérdida neuronal hipocampal inducida por estrés crónico impredecible (Parashar et al., 2017) y ácido neoclorogénico que disminuyó el estrés oxidativo en un modelo de enfermedad de Alzheimer del pez cebra (Gao et al., 2025).

13.3.2. Factor neurotrófico derivado del cerebro

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una neurotrofina que induce la translocación nuclear del factor de transcripción Nrf2, un regulador clave de la expresión de proteínas antioxidantes que protege a las células del daño oxidativo causado por lesiones e inflamación (Bruna et al., 2018). Se ha reportado que el BDNF está reducido en la Diabetes, y que es esencial para mantener las funciones de aprendizaje y memoria, al regular la supervivencia celular, la plasticidad sináptica y la proliferación, y al reducir la neuro inflamación en el sistema

nervioso central, se sugiere como un posible indicador independiente de complicaciones de la Diabetes (Ehtewish et al., 2022).

Debido a esto, en la presente tesis, se evaluó su presencia en el hipocampo; así en CA1, se observó que aumentó significativamente la cantidad de BDNF en los 4 grupos de ratas obesas con respecto a los grupos de ratas delgadas, además, se mostró un aumento significativo de la cantidad de BDNF en las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento al compararlas con sus controles. En CA3 se presentó un aumento de BDNF en los grupos OZDF NG VH, OZDF NG TX y OZDF HG TX, con respecto al grupo de delgado control, además, se muestra un aumento significativo de la cantidad de BDNF en las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento al compararlas con sus controles. En GD se presentó un aumento de BDNF en los grupos de ratas obesas OZDF NG VH, OZDF NG TX, OZDF HG TX, con respecto al grupo de delgado control, y también se puede ver que OZDF HG VH presenta niveles significativamente menores que los grupos obesos normoglucémico y una tendencia similar al ser comparado con su grupo tratamiento

Estos resultados, en conjunto, parecen indicar que en este estudio la obesidad tiene un papel crucial en las concentraciones de BDNF de ratas *Zucker Diabetic Fatty* después de 4 semanas de administración del extracto de orquídea *Prosthechea karwinskii* (TX), así como que el tratamiento parece tener un efecto dependiente del nivel de glucosa, por lo cual aumentó los niveles de BDNF de las ratas obesas hiperglucémicas tratamiento (OZDF HG TX), comparadas con su control (OZDF HG VH), así se puede decir que el extracto de hojas de *P. karwinskii* en general un aumentó en la cantidad de BDNF en el hipocampo en ratas OZDF HG, esto se puede deber a que el extracto de hojas de *P. karwinskii* contiene embelina, ya que además de que se ha descrito la embelina que puede atravesar la barrera hematoencefálica (Bhuvanendran et al., 2019) también se ha descrito que su administración aumentó los niveles de BDNF en tejido hipocampal en una condición similar a la enfermedad de Alzheimer inducida por escopolamina en un modelo de rata (Bhuvanendran et al., 2018). Este resultado es diferente a los esperado, si bien se observa un buen resultado como efecto de la administración

de extracto de hojas de *P. karwinskii*, aún está presente la duda de por qué los grupos control obesos presentan este incremento con respecto a las ratas delgadas normoglucémicas, ya que en la literatura se describe lo contrario, que en estados de obesidad y Diabetes los niveles de BDNF disminuyen (Ehtewish et al., 2022; Rao et al., 2015; Sun et al., 2018). Debido a que es la primera vez que se reportan los niveles de BDNF en el cerebro de las ratas *Zucker Diabetic Fatty* no se puede dilucidar bien cuál es la causa, una posibilidad es que en obesidad exista una compensación del daño en hipocampo a través del aumento de BDNF, que a través de la translocación de Nrf2 regula la expresión de proteínas antioxidantes (Bruna et al., 2018), otra posibilidad es que las ratas LEAN, a pesar de ser delgadas y normoglucémicas presenten niveles bajos de BDNF, lo cual tendría sentido con lo observado en la prueba NORT donde este grupo no presentó diferencias significativas en el índice de reconocimiento.

13.3.3. Astrocitos

Los astrocitos son células gliales y son esenciales para mantener la homeostasis cerebral, se cree que los astrocitos tienen dos papeles principales la citotoxicidad y la neuroprotección, dependiendo su fenotipo (Bélanger & Magistretti, 2009; Kim et al., 2022; Li et al., 2024), por lo que se decidió estudiarlos en esta tesis.

En el número de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP (**Figura 20**) se observó que en CA1, OZDF HG TX tienen una disminución vs LEAN VH y tendencias similares se observan al comprar el grupo OZDF NG TX y OZDF NG VH. En CA3, nuevamente las ratas OZDF HG TX presentan una disminución significativa al ser comparadas con los grupos: LEAN VH, LEAN TX, OZDF NG VH y su grupo control (OZDF HG VH); también el grupo OZDF NG TX presentó una disminución significativa al ser comparado con el grupo LEAN VH, así como, una tendencia similar al ser comprado con su grupo control. En GD de nuevo las ratas OZDF HGT TX presentan una disminución significativa, del número de astrocitos marcados, al ser comparadas con los grupos: LEAN VH, LEAN TX, OZDF NG VH, OZDF NG TX, así como, su grupo control (OZDF HG VH). Además, el grupo OZDF NG TX también presentó una disminución significativa, en el número de astrocitos

marcados, al ser comparado con el grupo LEAN VH y una tendencia similar al ser comprado con su grupo control (OZDF NG VH).

En conjunto estos resultados sugieren que, en el fenotipo Obeso y con hiperglucemia, la administración del extracto de *Prosthechea karwinskii*, disminuye la cantidad de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en las regiones hipocampales CA3 y GD, mientras que en el fenotipo Obeso y con niveles de glucosa normal, la administración del extracto de *Prosthechea karwinskii*, disminuye la cantidad de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en la región hipocampal GD. Debido a sus condiciones de inflamación de la obesidad y la Diabetes, se puede creer que este resultado es beneficioso, en caso de presentar un fenotipo que conduzca a la citotoxicidad, y puede deberse a que el extracto de hojas de *P. karwinskii* contiene rutina ya que se ha evidenciado que en un modelo murino de tauopatía, suprimió la gliosis y la neuroinflamación mediante la regulación negativa de la vía NF- κ B (Sun et al., 2021). Por otro lado debido a que la técnica no es específica y no permite determinar el fenotipo del astrocito, se debe plantear como perspectiva a futuro reconocer el fenotipo de los astrocitos, ya que puede ser que en las ratas LEAN abunde más el fenotipo neuroprotector, mientras que en ratas OZDF el fenotipo citotóxico.

13.3.4. Sinaptofisina

En la cuanto a sinaptofisina (SYP), es una proteína de vesículas sinápticas, cuya ausencia lleva a un desequilibrio en la liberación de neurotransmisores (Wang et al., 2024). En la **Figura 24** se puede observar la cuantificación de SYP presente en las regiones hipocampales CA1, CA3 y GD, de ratas *Zucker Diabetic Fatty*, después de 4 semanas de tratamiento. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que la integridad de las vesículas sinápticas es homogénea en todos los grupos.

13.4. Efecto del tratamiento en el perfil lipídico

En trabajos como el de Berra y col. (2019) o el de Otani y col. (2022), ya se han determinado los parámetros bioquímicos de las ratas *Zucker Diabetic Fatty*, y

como era de esperarse, por la naturaleza del biomodelo que desarrolla dislipidemia, los valores de las ratas OZDF son significativamente mayores que los de las ratas delgadas (Berra-Romani et al., 2019; Otani et al., 2022).

En este trabajo se encontraron resultados similares, pues las ratas OZDF en todas las pruebas del perfil de lípidos obtuvieron resultados mayores de las ratas delgadas. En primer lugar, se evaluó el colesterol sérico (**Figura 25**) donde, como era esperado, los grupos obesos presentaron niveles de colesterol significativamente mayores que los grupos delgados, tal como se ha reportado (Berra-Romani et al., 2019; Otani et al., 2022), pero a pesar de que los grupos tratamiento presentan valores menores que su respectivo control no llegan a ser diferencias significativas, contrario a lo reportado sobre el extracto en ratas Wistar con síndrome metabólico (Barragán-Zarate et al., 2024).

En cuanto a los triglicéridos séricos, también se observa que los grupos obesos tienen niveles significativamente mayores que los grupos delgados y, igual que lo observado por otros autores (Berra-Romani et al., 2019; Otani et al., 2022) en esta ocasión se puede apreciar que el tratamiento provocó la disminución de la concentración de triglicéridos séricos en las ratas OZDF HG TX, igual que como se observa en ratas con síndrome metabólico (Barragán-Zarate et al., 2024).

En el nivel de colesterol de alta densidad (HDL, comúnmente llamado “colesterol bueno”) nuevamente se aprecia que los grupos obesos presentaron niveles significativamente mayores que los grupos delgados. Este resultado se diferencia de lo reportado por otros autores (Berra-Romani et al., 2019) donde se reporta que no hay diferencia significativa. Como el nivel de HDL era muy alto se optó por utilizar el índice triglicéridos (TG)/ colesterol de alta densidad (HDL-c), el cual es un cociente lipoproteico utilizado como predictor de resistencia a la insulina, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular (Han et al., 2025; Kosmas et al., 2023; Yuge et al., 2023). Nuevamente los grupos delgados presentan los valores más bajos, siendo significativamente menores que los grupos OZDF NG VH, OZDF NG TX y OZDF HG VH. Además, se puede observar que el tratamiento provocó una disminución significativa de este índice en el grupo OZDF NG TX al compararse con

su grupo control, lo cual es indicativo de que el extracto disminuyó la dislipidemia de las ratas Obesas.

Por otra parte, los niveles de colesterol de baja densidad (LDL, comúnmente llamado “colesterol malo”), están disminuidos en el grupo OZDF NG TX al compararse con su grupo control. La misma tendencia se observa al comparar al grupo OZDF HG TX con su grupo control. Igualmente, los grupos delgados presentan niveles significativamente menores que los grupos obesos control, pero no que los grupos obesos tratamiento.

Así mismo, en los niveles de colesterol de muy baja densidad (VLDL) también se observa que los grupos obesos tienen niveles significativamente mayores que los grupos delgados, sin embargo, estos niveles de VLDL son significativamente menores en el grupo OZDF NG TX que en su grupo control, así como, son significativamente menores en el grupo OZDF HG TX que en su grupo control.

El efecto del extracto de hojas de *P. karwinskii* sobre los parámetros anteriores se puede deber a que la rutina disminuye la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, o a que la mejor tolerancia a la glucosa conduce a un menor almacenamiento de grasas (Barragan-Zarate et al., 2022; Ghorbani, 2017), también el ácido clorogénico presentes en el extracto de hojas de *P. karwinskii* pudo contribuir a estos resultados ya que su administración en pacientes con intolerancia a la glucosa mejoró su perfil lipídico (Zuñiga et al., 2018). Todos estos resultados muestran que el extracto de hojas de *P. karwinskii* sirve para tratar la dislipidemia, al disminuir los triglicéridos y el colesterol de baja y muy baja densidad, así como aumentar los niveles de HDL-c, lo que apoya los resultados de otras investigaciones con el mismo extracto y que reportan disminución de lípidos (Barragán-Zarate et al., 2024). Al mismo tiempo estos resultados, pueden ser otra vía a través de la cual el extracto de hojas de *P. karwinskii* se mejora el estado cognitivo, ya que la dislipidemia se asocia con el deterioro cognitivo (Rivas-Domínguez et al., 2023; Zhao et al., 2024).

14. Conclusiones

- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* disminuyó el aumento de peso ratas *Zucker Diabetic Fatty (ZDF)* obesas normoglucémicas.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* tuvo un efecto hipoglucemiante en ratas *ZDF* obesas hiperglucémicas.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* no tuvo efectos sobre los niveles de colesterol, pero sí provocó la disminución de triglicéridos en ratas OZDF HG, LDL-c en ratas OZDF NG y VLDL-c en ratas OZDF NG y HG, así como el aumento de los niveles de HDL-c que llevó a la disminución del índice triglicéridos/ HDL de las ratas OZDF NG.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* no tuvo efectos sobre la actividad motora de las ratas *ZDF*.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* mejoró la memoria de largo plazo de las ratas *ZDF* obesas hiperglucémicas.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* no tuvo efectos sobre las conductas asociadas a ansiedad de las ratas *ZDF*.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* produjo un aumento celular en GD de las ratas *ZDF* obesas hiperglucémicas.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* causó un aumento de la expresión de BDNF en CA1 y CA3 del hipocampo de las ratas *ZDF* obesas hiperglucémicas.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* provocó una la disminución de astrocitos marcados con anticuerpo anti-GFAP en CA3 y GD de las ratas *ZDF* obesas hiperglucémicas, y en GD de ratas *ZDF* obesas normoglucémicas.
- El extracto de hojas de la *Prosthechea karwinskii* no tuvo efectos sobre los niveles de SYP en el hipocampo de las ratas *ZDF*.

15. Perspectivas

Determinar cuáles son los compuestos bioactivos del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* que produjeron los resultados de esta tesis.

Identificar los posibles mecanismos por los cuales los compuestos bioactivos del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* generaron sus efectos.

Evaluar la morfología de los astrocitos de las regiones CA1, CA3 y GD de las ratas de este estudio.

Determinar cuál es el fenotipo de los astrocitos antes mencionados.

Contemplar un grupo control el cual no tenga manipulación con cánula oral, con el fin de determinar si esta manipulación tuvo un efecto negativo en las ratas de esta prueba.

Comparar los datos con ratas de mayor edad, por ejemplo, de 24 semanas, para evaluar el efecto del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* en un estado de Diabetes más avanzado.

16. Bibliografía

- Al-Awar, A., Kupai, K., Veszeka, M., Szűcs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A., & Varga, C. (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res*, 2016, 9051426. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>
- Alkasabera, A., Onyali, C. B., Anim-Koranteng, C., Shah, H. E., Ethirajulu, A., Bhawnani, N., & Mostafa, J. A. (2021). The Effect of Type-2 Diabetes on Cognitive Status and the Role of Anti-diabetes Medications. *Cureus*, 13(11), e19176. <https://doi.org/10.7759/cureus.19176>
- American Diabetes Association, A. (2026). 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2026. *Diabetes Care*, 49(Supplement_1), S27-S49. <https://doi.org/10.2337/dc26-S002>
- Ascaso, J. F. (2014). Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos [10.1016/j.medcli.2013.05.041]. *Medicina Clínica*, 143(3), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.05.041>
- Barragán-Zarate, G. S., Alexander-Aguilera, A., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., & Soto-Rodríguez, I. (2021). Bioactive compounds from *Prosthechea karwinskii* decrease obesity, insulin resistance, pro-inflammatory status, and cardiovascular risk in Wistar rats with metabolic syndrome. *J Ethnopharmacol*, 279, 114376. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114376>
- Barragán-Zarate, G. S., Lagunez-Rivera, L., Alexander-Aguilera, A., Solano, R., & Vilarem, G. (2024). Extraction, Characterization, and Nutraceutical Potential of *Prosthechea karwinskii* Orchid for Insulin Resistance and Oxidative Stress in Wistar Rats. *Foods*, 13(15). <https://doi.org/10.3390/foods13152432>
- Barragan-Zarate, G. S., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., Carranza-Alvarez, C., Hernandez-Benavides, D. M., & Vilarem, G. (2022). Validation of the traditional medicinal use of a Mexican endemic orchid (*Prosthechea karwinskii*) through UPLC-ESI-qTOF-MS/MS

- characterization of its bioactive compounds. *Heliyon*, 8(7), e09867. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09867>
- Barragán-Zarate, G. S., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., Pineda-Peña, E. A., Landa-Juárez, A. Y., Chávez-Piña, A. E., Carranza-Álvarez, C., & Hernández-Benavides, D. M. (2020). Prosthechea karwinskii, an orchid used as traditional medicine, exerts anti-inflammatory activity and inhibits ROS. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112632. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112632>
- Barragán-Zarate, G. S., Pérez-López, B. A., Cuéllar-Martínez, M., Solano, R., & Lagunez-Rivera, L. (2025). Chemical Variation of Leaves and Pseudobulbs in Prosthechea karwinskii (Orchidaceae) in Oaxaca, Mexico. *Plants (Basel)*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/plants14040608>
- Basu, J., & Siegelbaum, S. A. (2015). The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021733>
- Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci*, 11(3), 281-295. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.3/mbelanger>
- Berra-Romani, R., Guzmán-Silva, A., Vargaz-Guadarrama, A., Flores-Alonso, J. C., Alonso-Romero, J., Treviño, S., Sánchez-Gómez, J., Coyotl-Santiago, N., García-Carrasco, M., & Moccia, F. (2019). Type 2 Diabetes Alters Intracellular Ca(2+) Handling in Native Endothelium of Excised Rat Aorta. *Int J Mol Sci*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010250>
- Beyaz, F. (2025). Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons. In M. Turgut, N. Acer, A. T. Turgut, & C. Di Rocco (Eds.), *The Human Hippocampus: Development, Neuroanatomy, Neurophysiology, Neuropathology and Surgery* (pp. 23-37). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-88907-3_4

- Bhuvanendran, S., Hanapi, N. A., Ahemad, N., Othman, I., Yusof, S. R., & Shaikh, M. F. (2019). Embelin, a Potent Molecule for Alzheimer's Disease: A Proof of Concept From Blood-Brain Barrier Permeability, Acetylcholinesterase Inhibition and Molecular Docking Studies. *Front Neurosci*, 13, 495. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00495>
- Bhuvanendran, S., Kumari, Y., Othman, I., & Shaikh, M. F. (2018). Amelioration of Cognitive Deficit by Embelin in a Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-Like Condition in a Rat Model. *Front Pharmacol*, 9, 665. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00665>
- Biessels, G. J., & Despa, F. (2018). Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*, 14(10), 591-604. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0048-7>
- Bin Ibrahim, M. Z., Benoy, A., & Sajikumar, S. (2022). Long-term plasticity in the hippocampus: maintaining within and 'tagging' between synapses. *The FEBS Journal*, 289(8), 2176-2201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.16065>
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., & Ruiz-Albusac, J. M. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 161. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161>
- Bruna, B., Lobos, P., Herrera-Molina, R., Hidalgo, C., Paula-Lima, A., & Adasme, T. (2018). The signaling pathways underlying BDNF-induced Nrf2 hippocampal nuclear translocation involve ROS, RyR-Mediated Ca(2+) signals, ERK and PI3K. *Biochem Biophys Res Commun*, 505(1), 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.080>
- Capcarova, M. (2019). Zucker Diabetic Fatty Rats for Research in Diabetes. In E. Tvrdá & S. C. Chandra Yeniseti (Eds.), *Animal*

Models in Medicine and Biology. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.88161>

- Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, A. J., & Carranza-Álvarez, C. (2019). The endemic orchids of Mexico: a review [Review]. *Biologia*, 74(1).
<https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Castillo-Pérez, L. J., Ponce-Hernández, A., Alonso-Castro, A. J., Solano, R., Fortanelli-Martínez, J., Lagunez-Rivera, L., & Carranza-Álvarez, C. (2024). Medicinal Orchids of Mexico: A Review. *Pharmaceuticals* (Basel), 17(7).
<https://doi.org/10.3390/ph17070907>
- Chao, O. Y., Nikolaus, S., Yang, Y. M., & Huston, J. P. (2022). Neuronal circuitry for recognition memory of object and place in rodent models. *Neurosci Biobehav Rev*, 141, 104855.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104855>
- Chauhan, P., Jethwa, K., Rathawa, A., Chauhan, G., & Mehra, S. (2021). The Anatomy of the Hippocampus. In R. Pluta (Ed.), *Cerebral Ischemia*.
<https://doi.org/10.36255/exonpublications.cerebralischemia.2021.hippocampus>
- Cruz-Garcia, G., Gomez, R. S., & Rivera, L. L. (2014). Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico [Article]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 153-158.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.002>
- Ehtewish, H., Arredouani, A., & El-Agnaf, O. (2022). Diagnostic, Prognostic, and Mechanistic Biomarkers of Diabetes Mellitus-Associated Cognitive Decline. *Int J Mol Sci*, 23(11).
<https://doi.org/10.3390/ijms23116144>
- Gao, L., Wang, B., Cui, X., Xia, L., Li, X., Figueredo, Y. N., Li, D., Liu, K., Wang, H., & Jin, M. (2025). Neochlorogenic acid ameliorates Alzheimer's disease-like pathology via scavenging oxidative stress and restoring blood-brain barrier function in zebrafish.

- Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 138, 111334.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2025.111334>
- Gao, Y., Li, J., Xu, X., Wang, S., Yang, Y., Zhou, J., Zhang, L., Zheng, F., Li, X., & Wang, B. (2017). Embelin attenuates adipogenesis and lipogenesis through activating canonical Wnt signaling and inhibits high-fat diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*, 41(5), 729-738. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.35>
- Ghorbani, A. (2017). Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomed Pharmacother*, 96, 305-312.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>
- Gupta, M., Pandey, S., Rumman, M., Singh, B., & Mahdi, A. A. (2023). Molecular mechanisms underlying hyperglycemia associated cognitive decline. *IBRO Neuroscience Reports*, 14, 57-63.
<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.12.006>
- Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., & Reshi, M. S. (2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, 11(3).
<https://doi.org/10.3390/cells11030552>
- Han, M., Shen, Y., Guo, X., Hong, C., Ji, X., Guo, H., Jin, Y., & Yuan, H. (2025). Association between non-high-density lipoprotein cholesterol and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Endocr J*, 72(1), 43-51.
<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ24-0189>
- Harding, J. L., Pavkov, M. E., Magliano, D. J., Shaw, J. E., & Gregg, E. W. (2019). Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*, 62(1), 3-16.
<https://doi.org/10.1007/s00125-018-4711-2>
- Heikkilä, E., Hermant, A., Thevenet, J., Bermont, F., Kulkarni, S. S., Ratajczak, J., Santo-Domingo, J., Dioum, E. H., Canto, C., Barron, D., Wiederkehr, A., & De Marchi, U. (2019). The plant product

- quinic acid activates Ca^{2+} -dependent mitochondrial function and promotes insulin secretion from pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol*, 176(17), 3250-3263. <https://doi.org/10.1111/bph.14757>
- INEGI. (2025). *ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS (EDR)*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2025/edr/EDR2024_CP_ene-dic.pdf
- International Diabetes Federation, I. (2025). *The Diabetes Atlas*. <https://diabetesatlas.org/>
- Jackson ImmunoResearch. (2025). *Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure® Goat Anti-Mouse IgG (H+L)*. <https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/115-295-146>
- Kim, H., Leng, K., Park, J., Sorets, A. G., Kim, S., Shostak, A., Embalabala, R. J., Mlouk, K., Katdare, K. A., Rose, I. V. L., Sturgeon, S. M., Neal, E. H., Ao, Y., Wang, S., Sofroniew, M. V., Brunger, J. M., McMahon, D. G., Schrag, M. S., Kampmann, M., & Lippmann, E. S. (2022). Reactive astrocytes transduce inflammation in a blood-brain barrier model through a TNF-STAT3 signaling axis and secretion of alpha 1-antichymotrypsin. *Nat Commun*, 13(1), 6581. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34412-4>
- Koekkoek, P. S., Kappelle, L. J., van den Berg, E., Rutten, G. E. H. M., & Biessels, G. J. (2015). Cognitive function in patients with diabetes mellitus: guidance for daily care. *The Lancet Neurology*, 14(3), 329-340. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70249-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70249-2)
- Koriem, K. M. M., & Tharwat, H. A. K. (2023). Malic Acid Improves Behavioral, Biochemical, and Molecular Disturbances in the Hypothalamus of Stressed Rats. *J Integr Neurosci*, 22(4), 98. <https://doi.org/10.31083/j.jin2204098>
- Kosmas, C. E., Rodriguez Polanco, S., Bousvarou, M. D., Papakonstantinou, E. J., Peña Genao, E., Guzman, E., & Kostara,

- C. E. (2023). The Triglyceride/High-Density Lipoprotein Cholesterol (TG/HDL-C) Ratio as a Risk Marker for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Diagnostics (Basel)*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13050929>
- Kumawat, M., Sharma, T. K., Singh, I., Singh, N., Ghalaut, V. S., Vardey, S. K., & Shankar, V. (2013). Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. *N Am J Med Sci*, 5(3), 213-219. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.109193>
- Landry, T., & Huang, H. (2021). Mini review: The relationship between energy status and adult hippocampal neurogenesis. *Neurosci Lett*, 765, 136261. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136261>
- Li, Z., Jiang, Y. Y., Long, C., Peng, X., Tao, J., Pu, Y., & Yue, R. (2024). Bridging metabolic syndrome and cognitive dysfunction: role of astrocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 15, 1393253. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1393253>
- Liu, K. F., Niu, C. S., Tsai, J. C., Yang, C. L., Peng, W. H., & Niu, H. S. (2022). Comparison of area under the curve in various models of diabetic rats receiving chronic medication. *Arch Med Sci*, 18(4), 1078-1087. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.91471>
- Liu, T., Lee, J. E., Wang, J., Ge, S., & Li, C. (2019). Cognitive Dysfunction in Persons with Type 2 Diabetes Mellitus: A Concept Analysis. *Clinical Nursing Research*, 29(5), 339-351. <https://doi.org/10.1177/1054773819862973>
- Lizardo, M., López, M., González-Mayo, G., Triana, L., Smith, M., Tovar, A., Cabello, R., Ucero, C. T., Navarro, M. d. P., Camacho, M., & Vicci, H. (2017). ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2. *Comunidad y Salud*, 15(2), 1-13. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375754623002> (IN FILE)

- Llorián-Salvador, M., Cabeza-Fernández, S., Gomez-Sanchez, J. A., & de la Fuente, A. G. (2024). Glial cell alterations in diabetes-induced neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*, 81(1), 47. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-05024-y>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Lynch, G., Kessler, M., Arai, A., & Larson, J. (1990). The nature and causes of hippocampal long-term potentiation. *Prog Brain Res*, 83, 233-250. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61253-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61253-4)
- Ma, Y., Liu, Y., Sun, A., Du, Y., Ye, M., Pu, X., & Qi, X. (2017). Intestinal absorption and neuroprotective effects of kaempferol-3-O-rutinoside [10.1039/C7RA05415G]. *RSC Advances*, 7(50), 31408-31416. <https://doi.org/10.1039/C7RA05415G>
- Maciejczyk, M., Żebrowska, E., & Chabowski, A. (2019). Insulin Resistance and Oxidative Stress in the Brain: What's New? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 874.
- Madhu, L. N., Kodali, M., & Shetty, A. K. (2022). Promise of metformin for preventing age-related cognitive dysfunction. *Neural Regen Res*, 17(3), 503-507. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320971>
- Malone, J. I., & Hansen, B. C. (2019). Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? *Pediatr Diabetes*, 20(1), 5-9. <https://doi.org/10.1111/pedi.12787>
- McNay, E. C., & Pearson-Leary, J. (2020). GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. *Exp Neurol*, 323, 113076. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113076>
- McNeilly, A. D., Gallagher, J. R., Evans, M. L., de Galan, B. E., Pedersen-Bjergaard, U., Thorens, B., Dinkova-Kostova, A. T., Huang, J.-T., Ashford, M. L. J., McCrimmon, R. J., & on behalf of the Hypo, R. C. (2023). Chronic hyperglycaemia increases the vulnerability of

- the hippocampus to oxidative damage induced during post-hypoglycaemic hyperglycaemia in a mouse model of chemically induced type 1 diabetes. *Diabetologia*, 66(7), 1340-1352. <https://doi.org/10.1007/s00125-023-05907-6>
- Milne, N. T., Bucks, R. S., Davis, W. A., Davis, T. M. E., Pierson, R., Starkstein, S. E., & Bruce, D. G. (2018). Hippocampal atrophy, asymmetry, and cognition in type 2 diabetes mellitus. *Brain Behav*, 8(1), e00741. <https://doi.org/10.1002/brb3.741>
- Moreno-Salgado, A., Coyotl-Santiago, N., Moreno-Vazquez, R., Lopez-Teyssier, M., Garcia-Carrasco, M., Moccia, F., & Berra-Romani, R. (2023). Alterations of the Ca(2+) clearing mechanisms by type 2 diabetes in aortic smooth muscle cells of Zucker diabetic fatty rat. *Front Physiol*, 14, 1200115. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1200115>
- Muriach, M., Flores-Bellver, M., Romero, F. J., & Barcia, J. M. (2014). Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 102158. <https://doi.org/10.1155/2014/102158>
- Nikon Instruments Inc. (2025a). *Blue Excitation: B-2A (Longpass Emission)*. <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/nikon-fluorescence-filter-sets/blue-excitation-filter-sets/blue-excitation-b-2a-longpass-emission>
- Nikon Instruments Inc. (2025b). *Ultraviolet Excitation: UV-1A (Longpass Emission)*. <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/nikon-fluorescence-filter-sets/ultraviolet-excitation-filter-sets/ultraviolet-excitation-uv-1a-longpass-emission>
- Nongdam, P. (2014). Ethno-medicinal Uses of some Orchids of Nagaland, North-east India. *Research Journal of Medicinal Plant*, 8, 126-139. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.126.139>
- Nowotny, K., Jung, T., Hohn, A., Weber, D., & Grune, T. (2015). Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2

- diabetes mellitus. *Biomolecules*, 5(1), 194-222.
<https://doi.org/10.3390/biom5010194>
- Okoduwa, S. I. R., Umar, I. A., James, D. B., & Inuwa, H. M. (2017). Anti-Diabetic Potential of *Ocimum gratissimum* Leaf Fractions in Fortified Diet-Fed Streptozotocin Treated Rat Model of Type-2 Diabetes. *Medicines (Basel)*, 4(4).
<https://doi.org/10.3390/medicines4040073>
- Otani, K., Funada, H., Teranishi, R., Okada, M., & Yamawaki, H. (2022). Cardiovascular Characteristics of Zucker Fatty Diabetes Mellitus Rats, an Animal Model for Obesity and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/ijms23084228>
- Parashar, A., Mehta, V., & Udayabanu, M. (2017). Rutin alleviates chronic unpredictable stress-induced behavioral alterations and hippocampal damage in mice. *Neurosci Lett*, 656, 65-71.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.058>
- Park, Y., Paing, Y. M. M., Cho, N., Kim, C., Yoo, J., Choi, J. W., & Lee, S. H. (2024). Quinic Acid Alleviates Behavior Impairment by Reducing Neuroinflammation and MAPK Activation in LPS-Treated Mice. *Biomol Ther (Seoul)*, 32(3), 309-318.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2023.184>
- Rao, A. A., Kumar, A., Babu, S., Parihar, A., & Senkhula, S. (2015). Association of BDNF levels and musculoskeletal problems in Type 2 diabetes [Article]. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*(9789812870490), 81-86.
https://doi.org/10.1007/978-981-287-050-6_9
- Rivas-Domínguez, A., Mohamed-Mohamed, H., Jimenez-Palomares, M., García-Morales, V., Martinez-Lopez, L., Orta, M. L., Ramos-Rodriguez, J. J., & Bermudez-Pulgarin, B. (2023). Metabolic Disturbance of High-Saturated Fatty Acid Diet in Cognitive Preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8042.
- Rojas-Olivos, A., Solano-Gómez, R., Alexander-Aguilera, A., Jiménez-Estrada, M., Zilli-Hernández, S., & Lagunez-Rivera, L. (2017).

- Effect of *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) on obesity and dyslipidemia in Wistar rats. *Alexandria Journal of Medicine*, 53(4), 311-315.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajme.2016.11.004>
- Sadikan, M. Z., Nasir, N. A. A., Iezhitsa, I., & Agarwal, R. (2021). Open field mirror test as a tool for the assessment of visual functions in rats with streptozotocin-induced diabetes [Article]. *Neuroscience Research Notes*, 4(3), 11-20.
<https://doi.org/10.31117/neuroscirn.v4i3.74>
- Sakaguchi, K., Takeda, K., Maeda, M., Ogawa, W., Sato, T., Okada, S., Ohnishi, Y., Nakajima, H., & Kashiwagi, A. (2016). Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance. *Diabetol Int*, 7(1), 53-58.
<https://doi.org/10.1007/s13340-015-0212-4>
- Salleh, S. Z., Hamid, A. A., Jaafar, A. H., Abdul Majid, N. D., Saari, N., Halim, H. H., Ismail, A., Abdul Razis, A. F., Ramli, N. S., & Pak Dek, M. S. (2022). Ergogenic property of *Morinda citrifolia* L. leaf extract affects energy metabolism in obese Sprague Dawley rats. *J Food Biochem*, 46(1), e14027.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.14027>
- Santa Cruz Biotechnology, I. (2025). *UltraCruz® Aqueous Mounting Medium with DAPI*: sc-24941.
https://www.scbt.com/es/p/ultracruz-aqueous-mounting-medium-with-dapi?srsId=AfmBOoq4Ti3HKkbAA3zh_05uCobaEAbUafN3Rm5DG1pM6adbWKdC1XHI
- Santos-Escamilla, M. H., Cruz-Lustre, G., Cuéllar-Martínez, M., Lagunez-Rivera, L., & Solano, R. (2024). Variation in the Floral Morphology of *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae), a Mexican Endemic Orchid at Risk. *Plants (Basel)*, 13(14).
<https://doi.org/10.3390/plants13141984>
- Saputri, R., Arfian, N., Yunus, J., Munawaroh, F., Kencana, S. M. S., & Sari, D. C. R. (2024). Chlorogenic acid ameliorates memory

- dysfunction via attenuating frontal lobe oxidative stress and apoptosis in diabetic rat model. *Turk J Med Sci*, 54(4), 866-875. <https://doi.org/10.55730/1300-0144.5858>
- Sato, N., & Morishita, R. (2014). Brain Alterations and Clinical Symptoms of Dementia in Diabetes: A β /Tau-Dependent and Independent Mechanisms [Review]. *Frontiers in Endocrinology*, Volume 5 - 2014. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00143>
- Secretaría de Salud. (2012). Protocolo Clínico para el Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes. In C. S. d. Salud (Ed.), (Vol. 2a edición). www.salud.gob.mx
- Shi, H. J., Wang, S., Wang, X. P., Zhang, R. X., & Zhu, L. J. (2023). Hippocampus: Molecular, Cellular, and Circuit Features in Anxiety. *Neurosci Bull*, 39(6), 1009-1026. <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01020-1>
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2022). Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030950>
- Spoelder, M., Bright, Y., Morrison, M. C., van Kempen, V., de Groodt, L., Begalli, M., Schuijt, N., Kruiger, E., Bulthuis, R., Gross, G., Kleemann, R., van Diepen, J. A., & Homberg, J. R. (2023). Cognitive Performance during the Development of Diabetes in the Zucker Diabetic Fatty Rat. *Cells*, 12(20), 2463.
- Sun, X. Y., Li, L. J., Dong, Q. X., Zhu, J., Huang, Y. R., Hou, S. J., Yu, X. L., & Liu, R. T. (2021). Rutin prevents tau pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 18(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02182-3>
- Sun, Z. C., Yu, J., Liu, Y. L., Hong, Z. Z., Ling, L., Li, G. Q., Zhuo, Y. F., Wang, W. R., & Zhang, Y. (2018). Reduced serum levels of brain-derived neurotrophic factor are related to mild cognitive impairment in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus

- [Article]. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 73(4), 271-281.
<https://doi.org/10.1159/000493275>
- Taylor, K., Rego Alvarez, L., & Grange, E. (2025). The Prevalence of Reported Gavage Incidents in Repeated Dose Toxicity Studies Involving Rats Conducted Between 2004–2023. *Alternatives to Laboratory Animals*, 53(3), 154-167.
<https://doi.org/10.1177/02611929251334721>
- Tekwe, C. D., Lei, J., Yao, K., Rezaei, R., Li, X., Dahanayaka, S., Carroll, R. J., Meininger, C. J., Bazer, F. W., & Wu, G. (2013). Oral administration of interferon tau enhances oxidation of energy substrates and reduces adiposity in Zucker diabetic fatty rats [Article]. *BioFactors*, 39(5), 552-563.
<https://doi.org/10.1002/biof.1113>
- Terreros-Roncal, J., Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Rodríguez-Moreno, C. B., Trinchero, M. F., Cafini, F., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2021). Impact of neurodegenerative diseases on human adult hippocampal neurogenesis. *Science*, 374(6571), 1106-1113.
<https://doi.org/10.1126/science.abl5163>
- Võikar, V., & Stanford, S. C. (2023). The Open Field Test. In *Neuromethods* (Vol. 190, pp. 9-29).
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2748-8_2
- Wachal, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Hegedűs, C., Kovács, D., Szabó, A. M., Kiss, R., Németh, J., Juhász, B., Szilvássy, Z., & Varga, B. (2020). Retinoprotection by BGP-15, a Hydroximic Acid Derivative, in a Type II Diabetic Rat Model Compared to Glibenclamide, Metformin, and Pioglitazone. *Int J Mol Sci*, 21(6).
<https://doi.org/10.3390/ijms21062124>
- Wang, C., Jiang, W., Leitz, J., Yang, K., Esquivies, L., Wang, X., Shen, X., Held, R. G., Adams, D. J., Basta, T., Hampton, L., Jian, R., Jiang, L., Stowell, M. H. B., Baumeister, W., Guo, Q., & Brunger, A. T. (2024). Structure and topography of the synaptic V-ATPase-

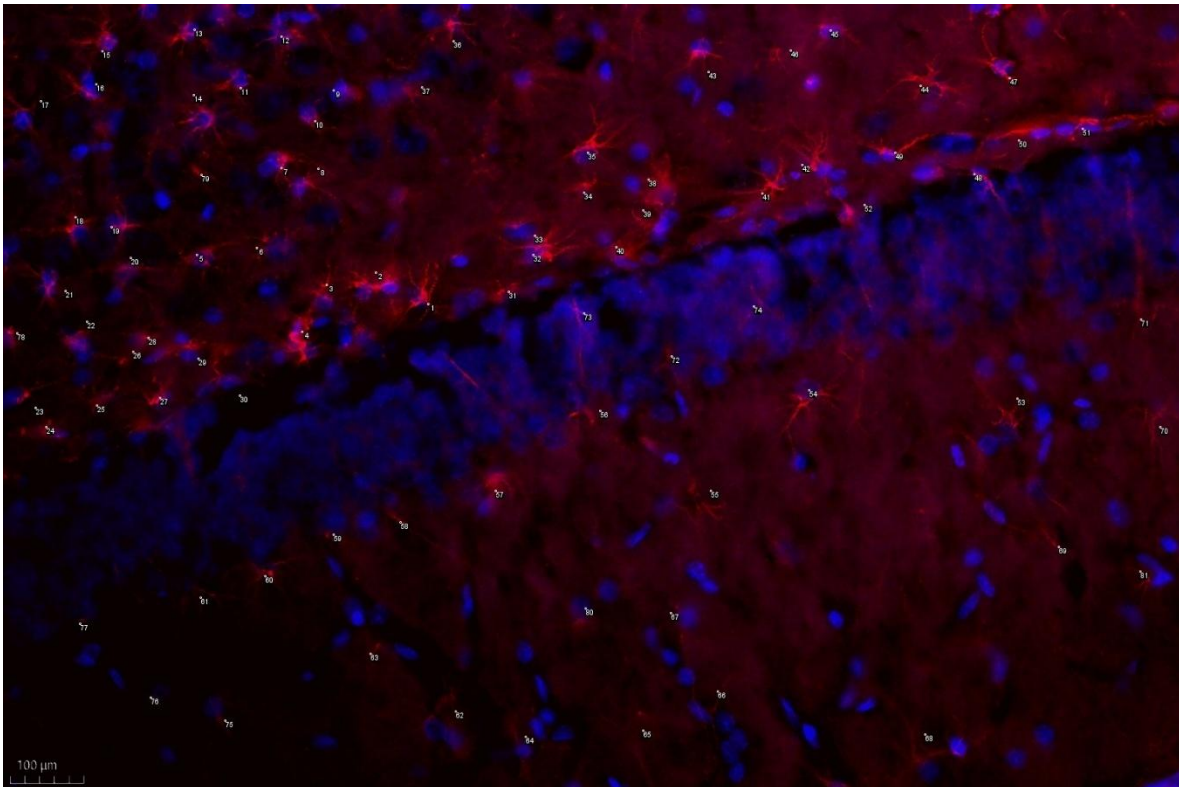
- synaptophysin complex. *Nature*, 631(8022), 899-904.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07610-x>
- Wang, X., DuBois, D. C., Sukumaran, S., Ayyar, V., Jusko, W. J., & Almon, R. R. (2014). Variability in Zucker diabetic fatty rats: differences in disease progression in hyperglycemic and normoglycemic animals. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7, 531-541. <https://doi.org/10.2147/dmso.S69891>
- Wang, Y. W., Sun, G. D., Sun, J., Liu, S. J., Wang, J., Xu, X. H., & Miao, L. N. (2013). Spontaneous type 2 diabetic rodent models. *J Diabetes Res*, 2013, 401723. <https://doi.org/10.1155/2013/401723>
- World Health Organization, W. (2020). *HEARTS D: diagnosis and management of type 2 diabetes*. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/331710>
- Xiong, H., Zhang, J., & Liu, J. (2017). Hippocampus, Spatial Memory and Neuroimmunomodulation. In T. Ikezu & H. E. Gendelman (Eds.), *Neuroimmune Pharmacology* (pp. 69-79). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44022-4_6
- Yonamine, C. Y., Michalani, M. L. E., Moreira, R. J., & Machado, U. F. (2023). Glucose Transport and Utilization in the Hippocampus: From Neurophysiology to Diabetes-Related Development of Dementia. *Int J Mol Sci*, 24(22). <https://doi.org/10.3390/ijms242216480>
- Yuge, H., Okada, H., Hamaguchi, M., Kurogi, K., Murata, H., Ito, M., & Fukui, M. (2023). Triglycerides/HDL cholesterol ratio and type 2 diabetes incidence: Panasonic Cohort Study 10. *Cardiovasc Diabetol*, 22(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-02046-5>
- Zhao, Y., Zhang, H., Cheng, J., Zou, Y., Zhang, D., & Duan, X. (2024). Association between Dyslipidaemia and Cognitive Impairment: A Meta-Analysis of Cohort and Case-Control Studies. *J. Integr. Neurosci.*, 23(2). <https://doi.org/10.31083/j.jin2302040>

- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*, 14(2), 88-98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
- Zuñiga, L. Y., Aceves-de la Mora, M. C. A., González-Ortiz, M., Ramos-Núñez, J. L., & Martínez-Abundis, E. (2018). Effect of Chlorogenic Acid Administration on Glycemic Control, Insulin Secretion, and Insulin Sensitivity in Patients with Impaired Glucose Tolerance. *J Med Food*, 21(5), 469-473. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0110>

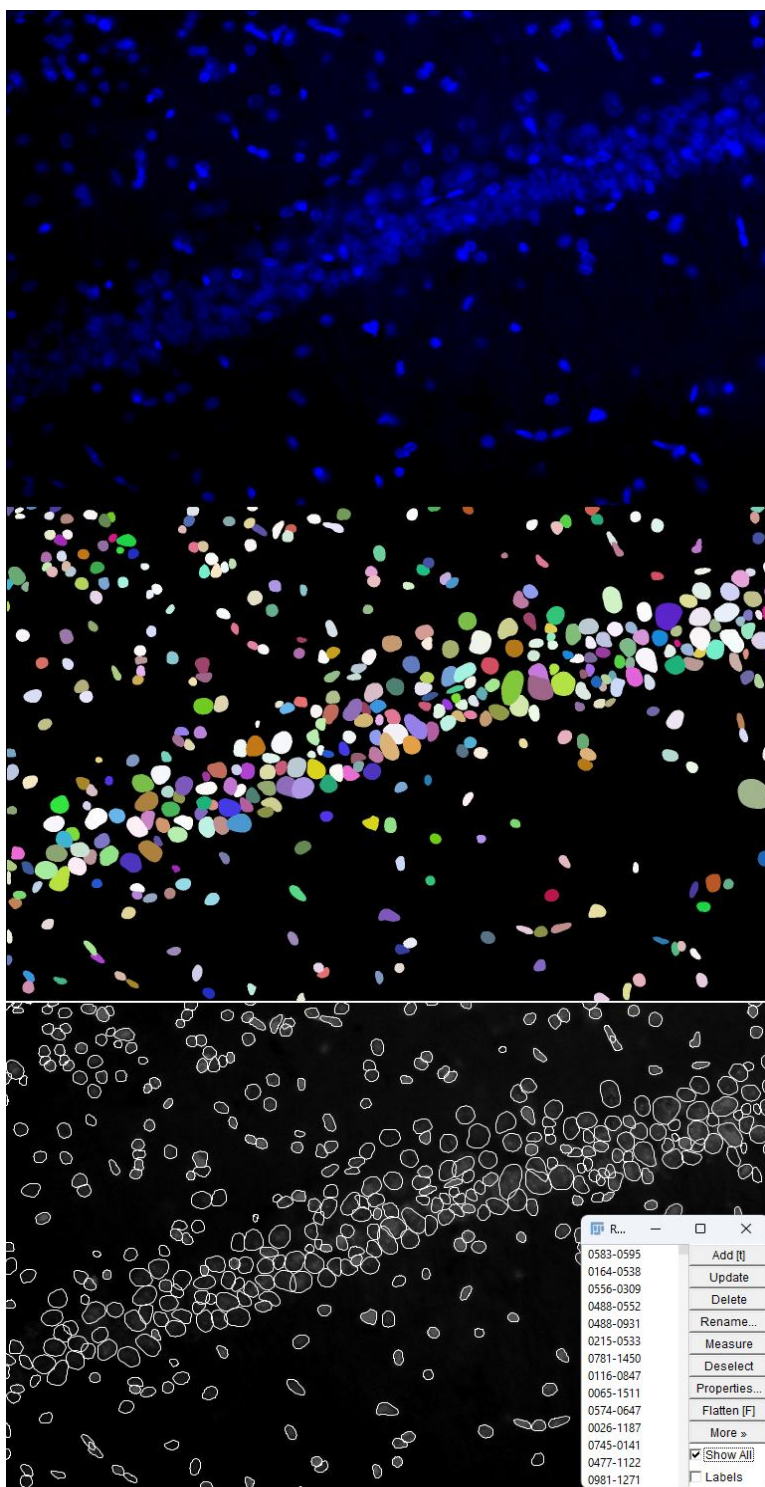
17. Anexos

17.1. Anexo 1. Determinación de ROIs

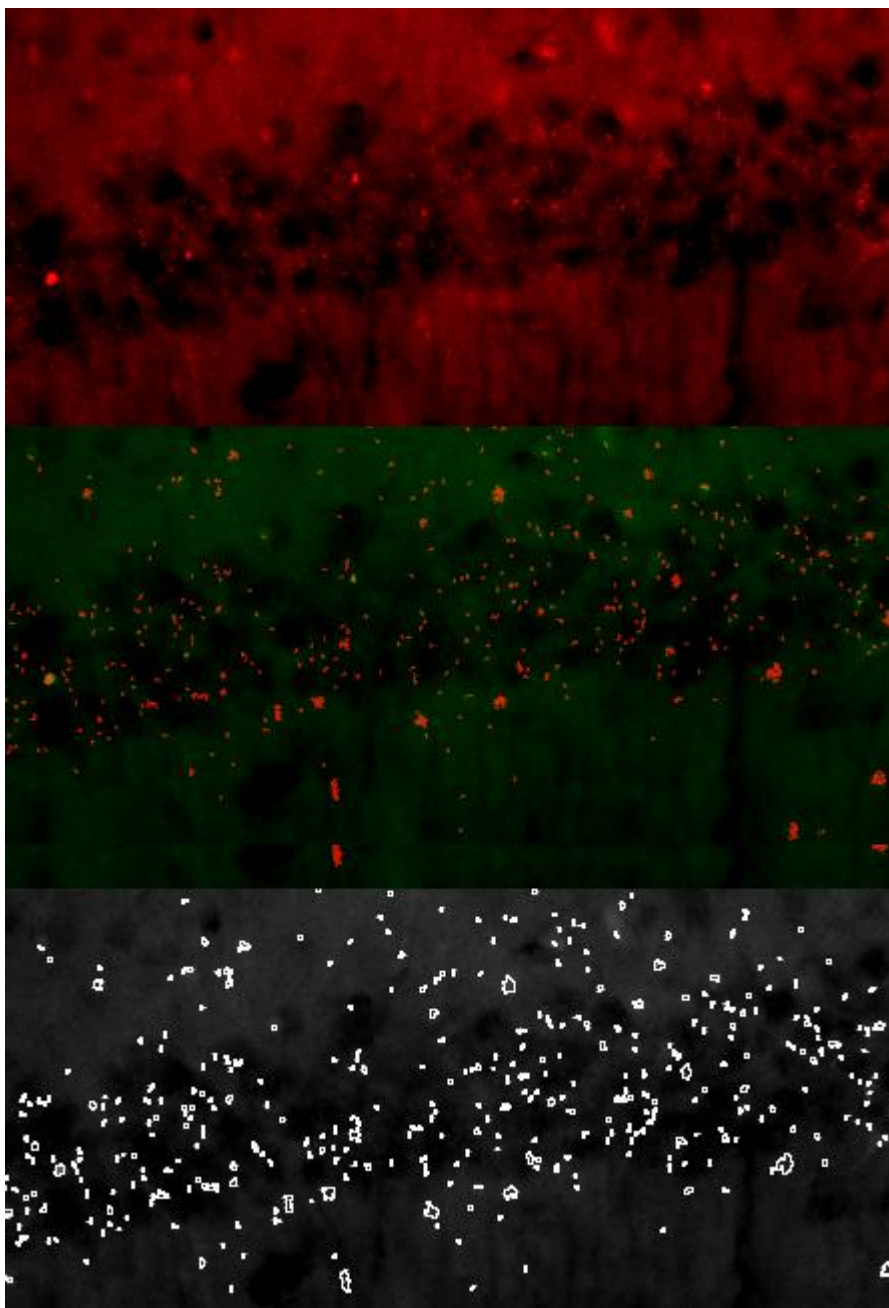
Determinación manual de ROIs para contero de astrocitos reactivos.



Conteo celular de núcleos marcados con DAPI

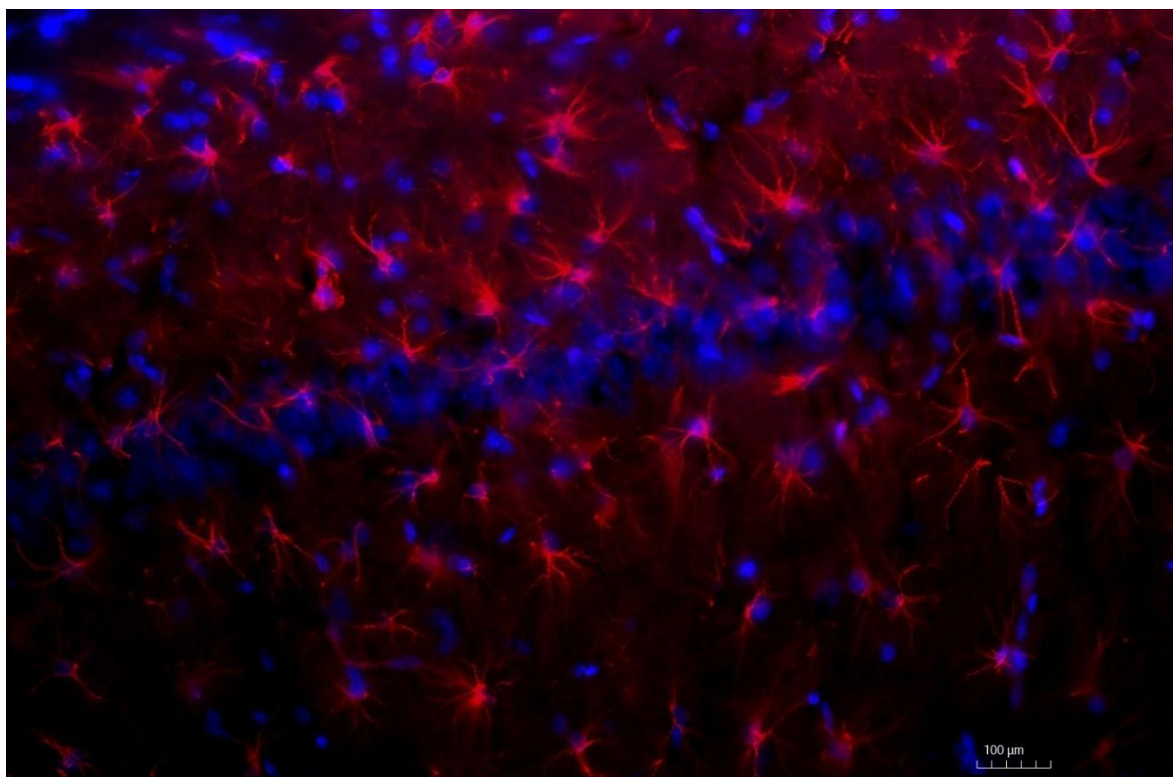


Determinación de ROIs para marcas de BDNF / SYP

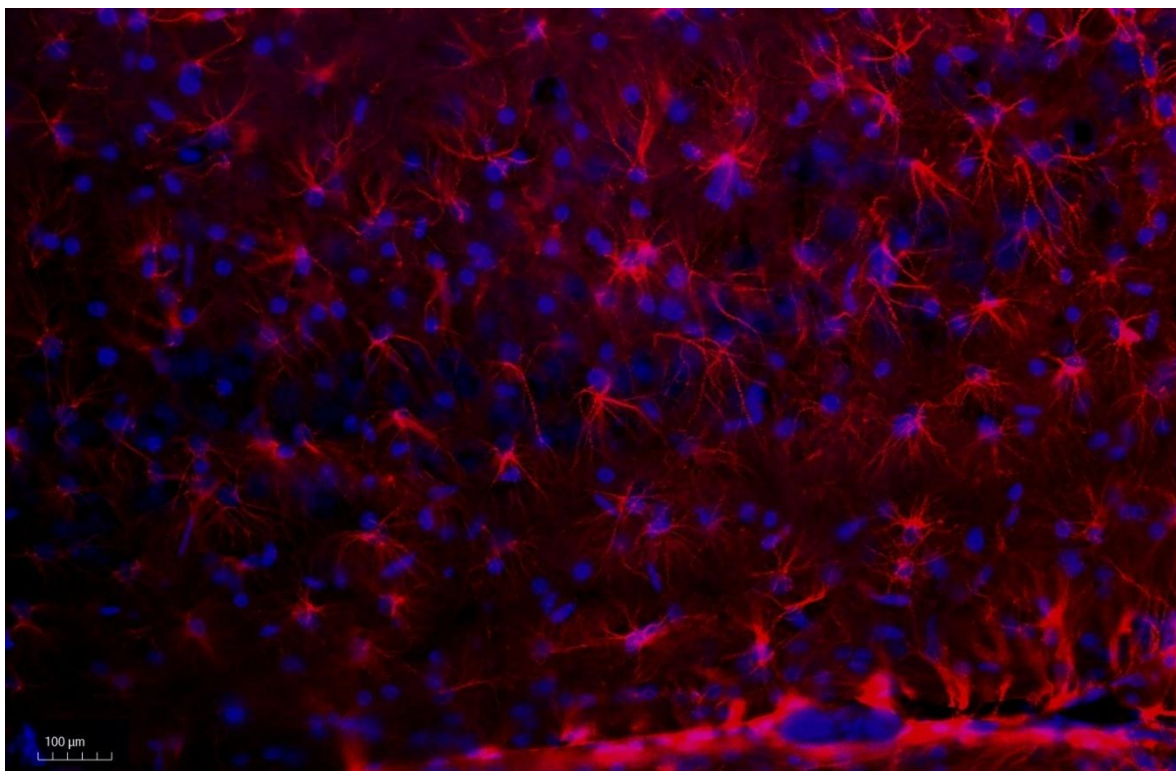


17.2. Anexo 2. Microfotografías GFAP

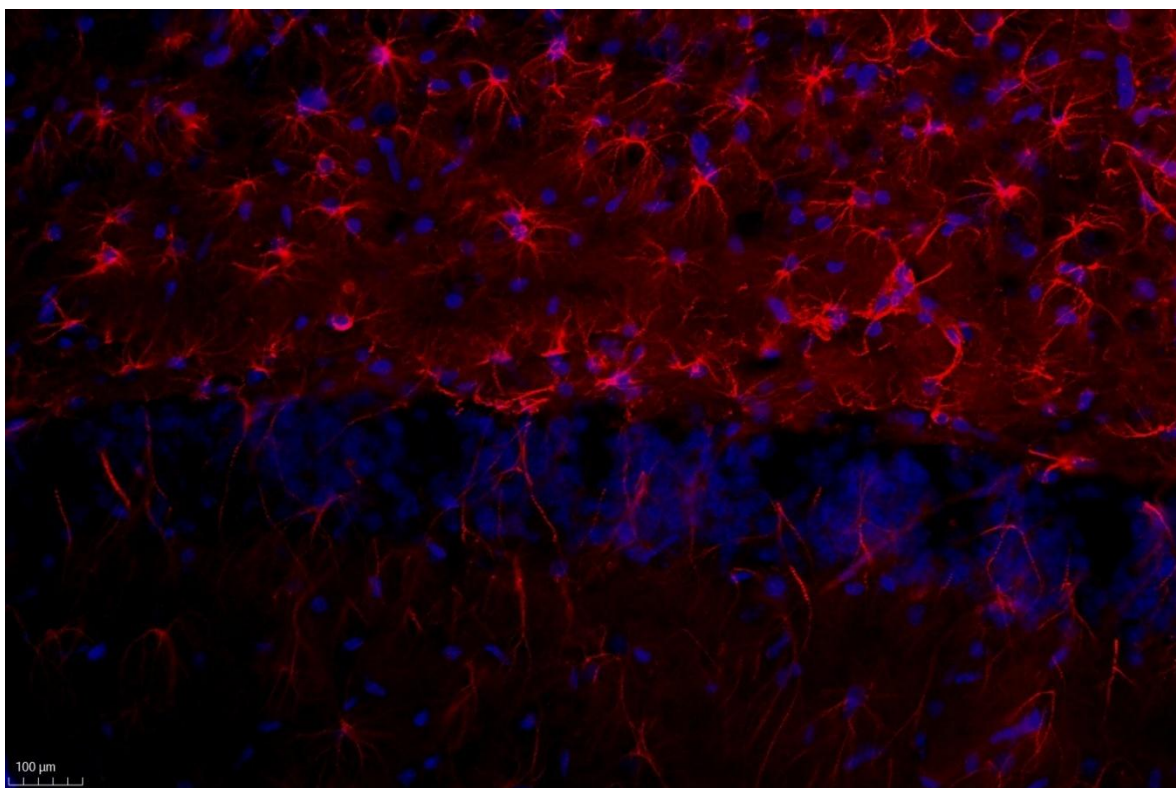
LEAN VH CA1



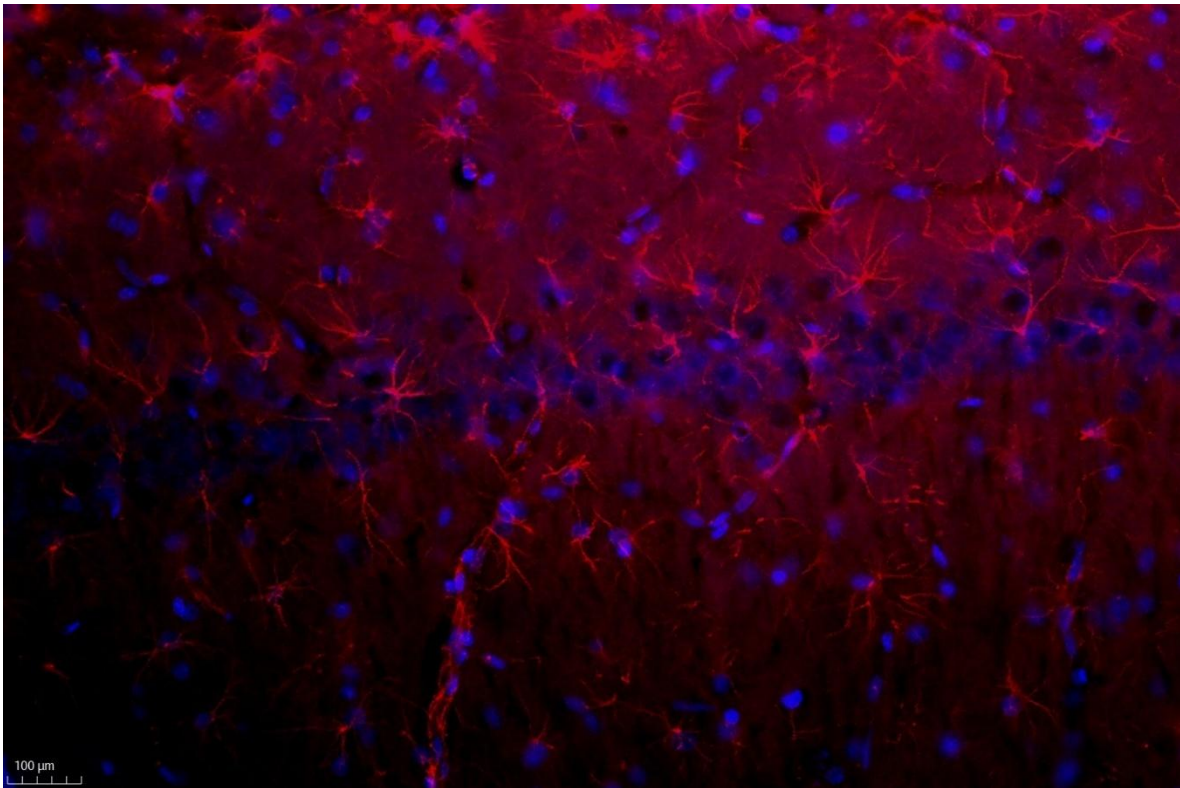
LEAN VH CA3



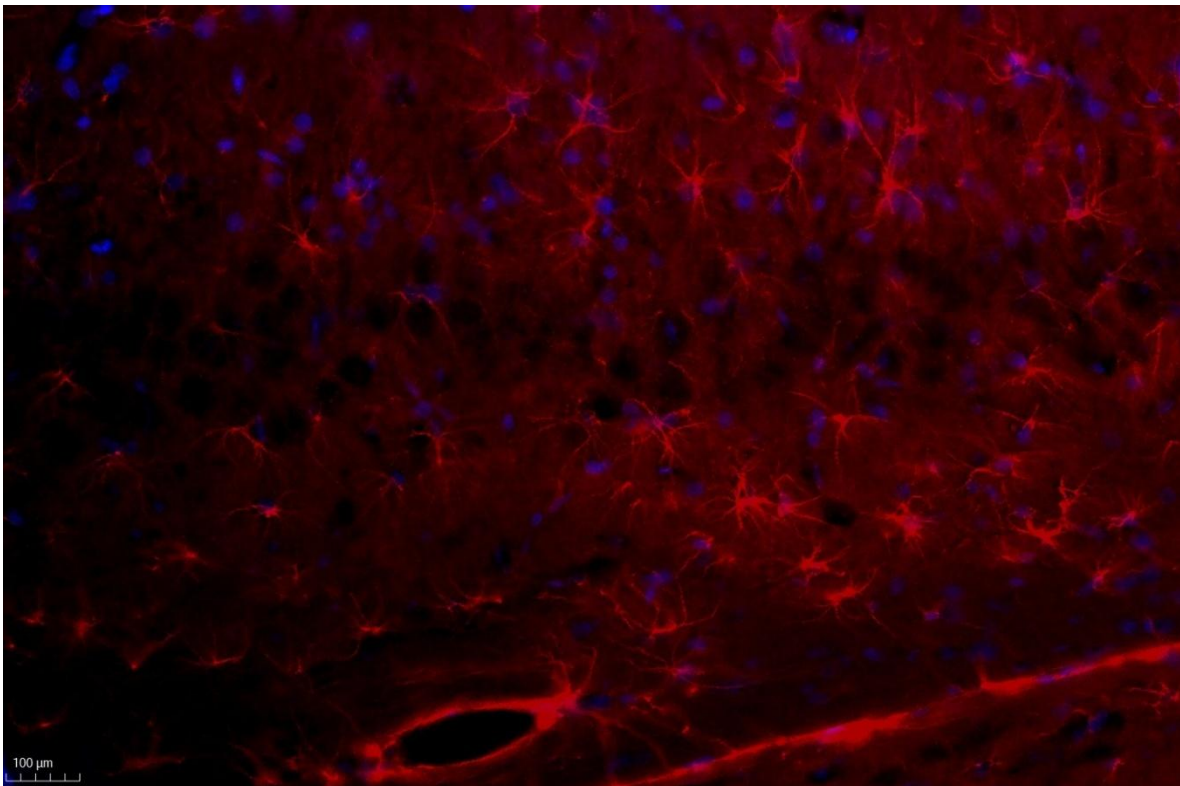
LEAN VH GD



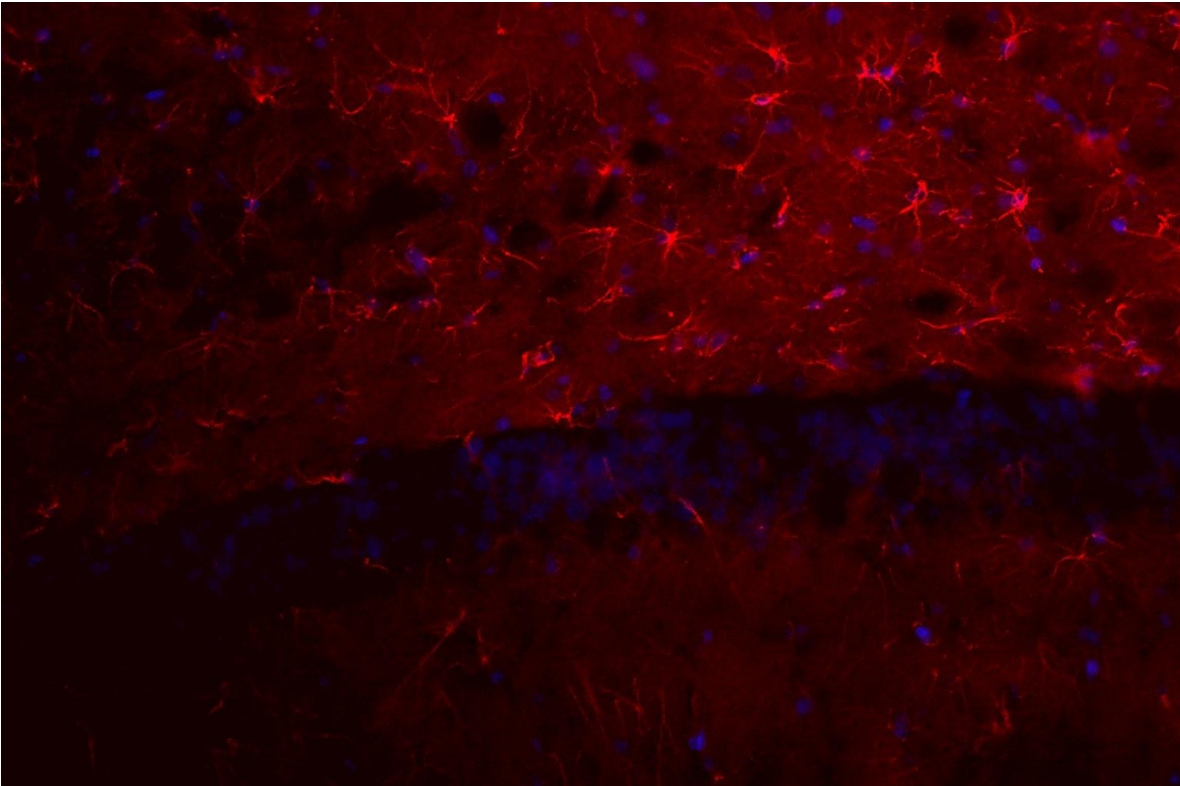
LEAN TX CA1



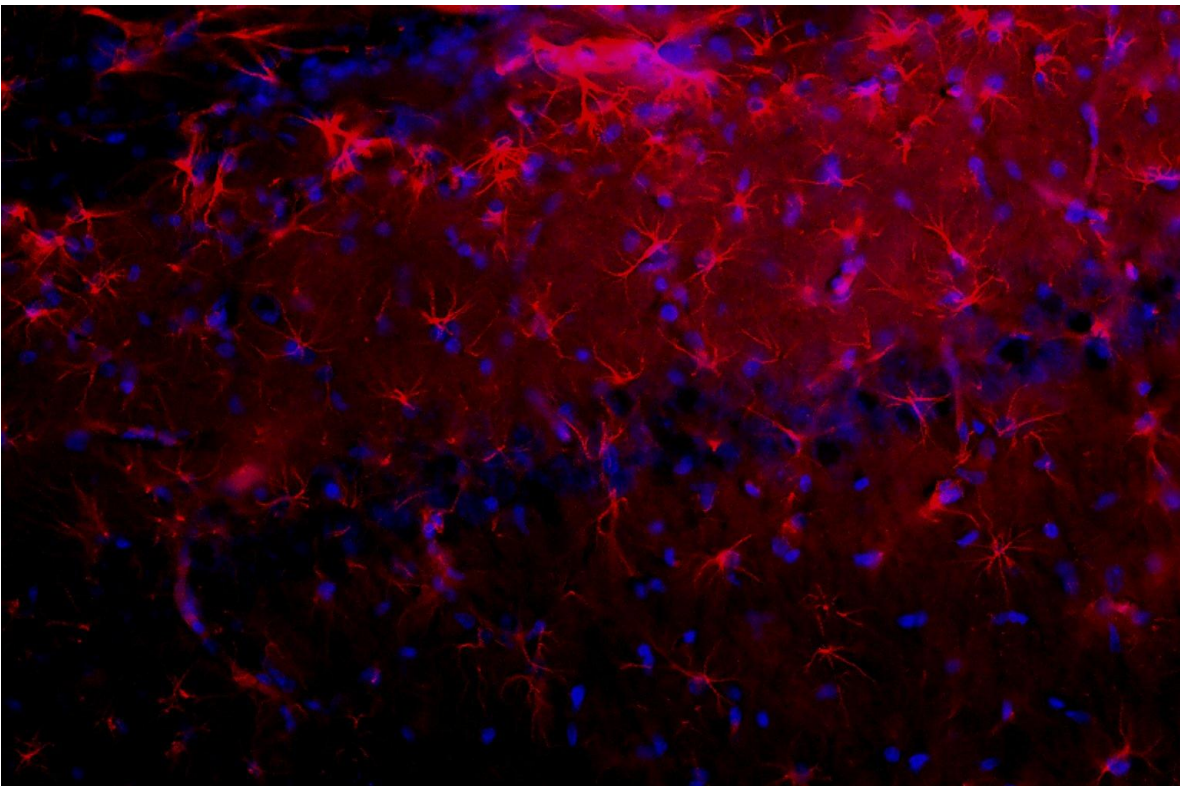
LEAN TX CA3



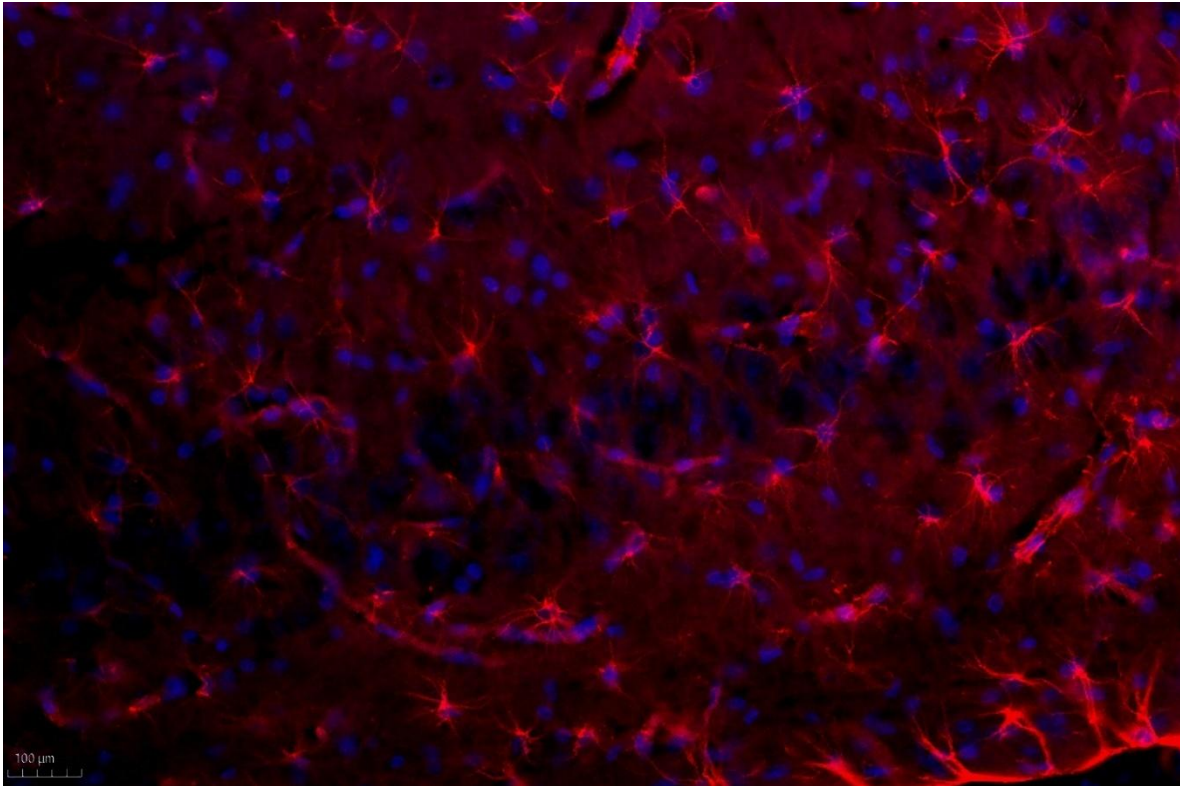
LEAN TX GD



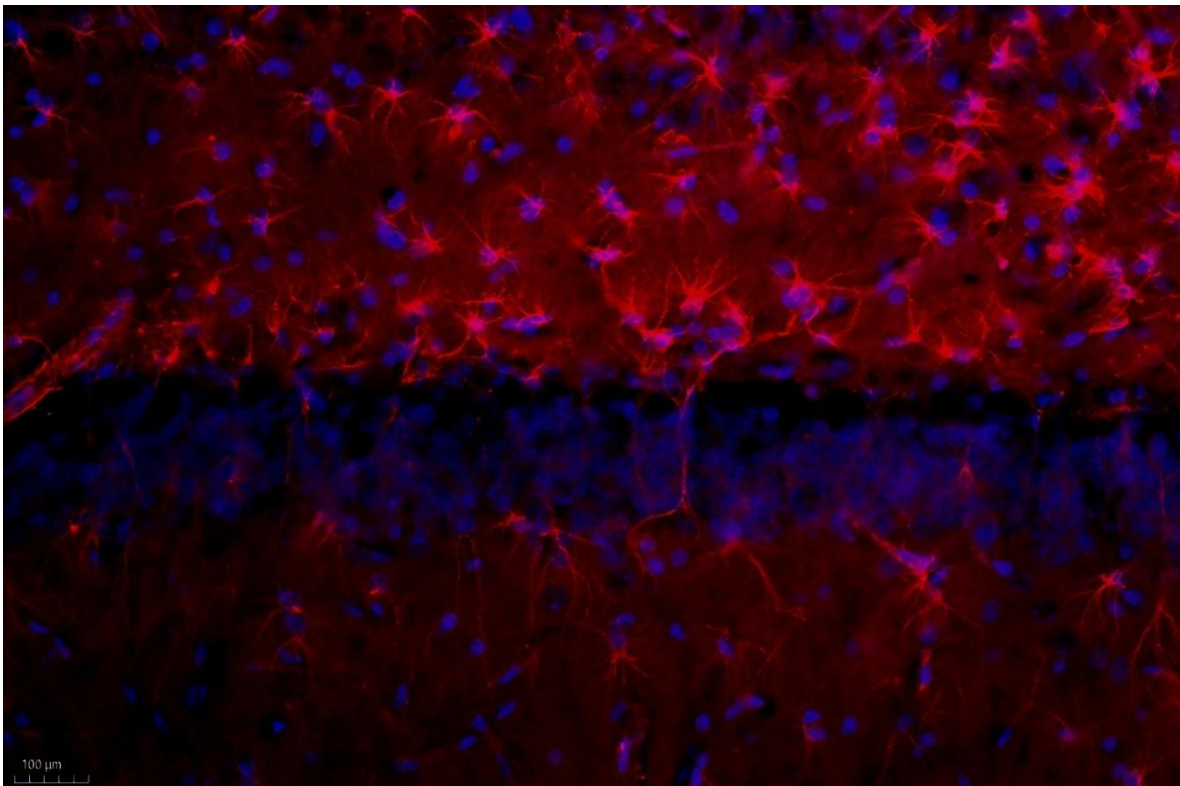
OZDF NG VH CA1



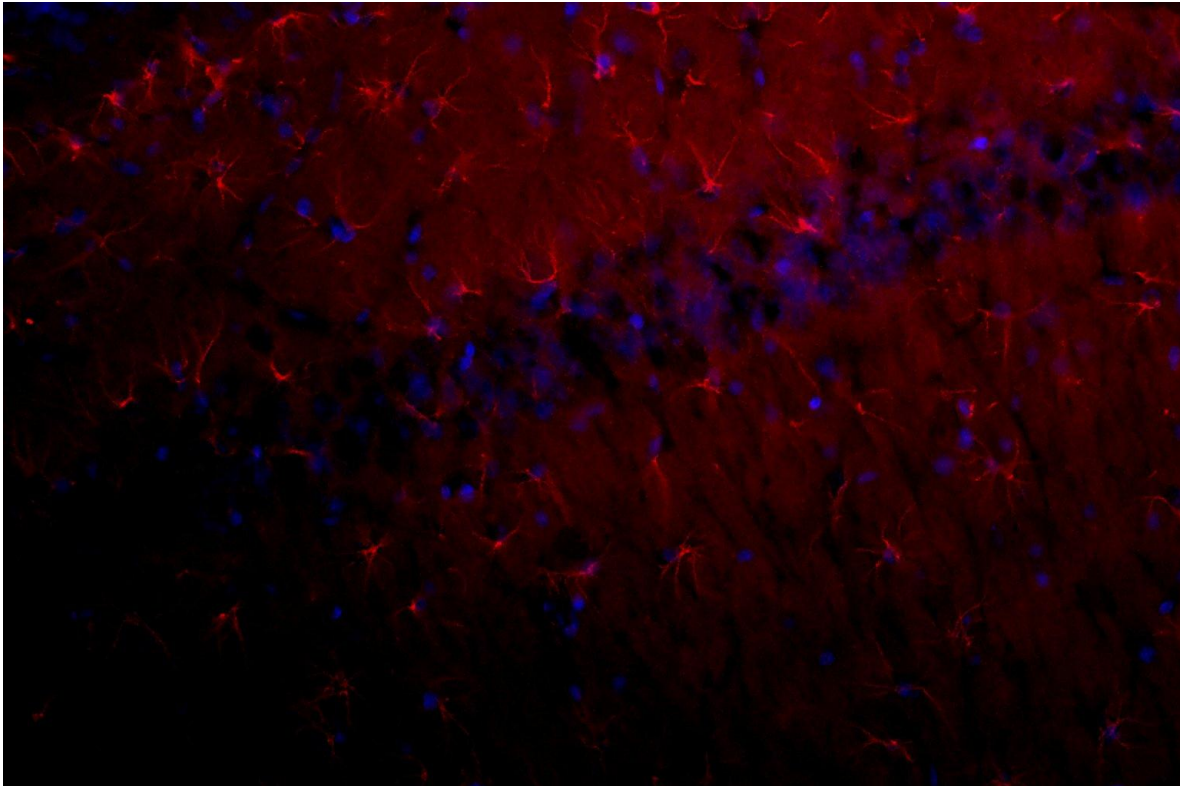
OZDF NG VH CA3



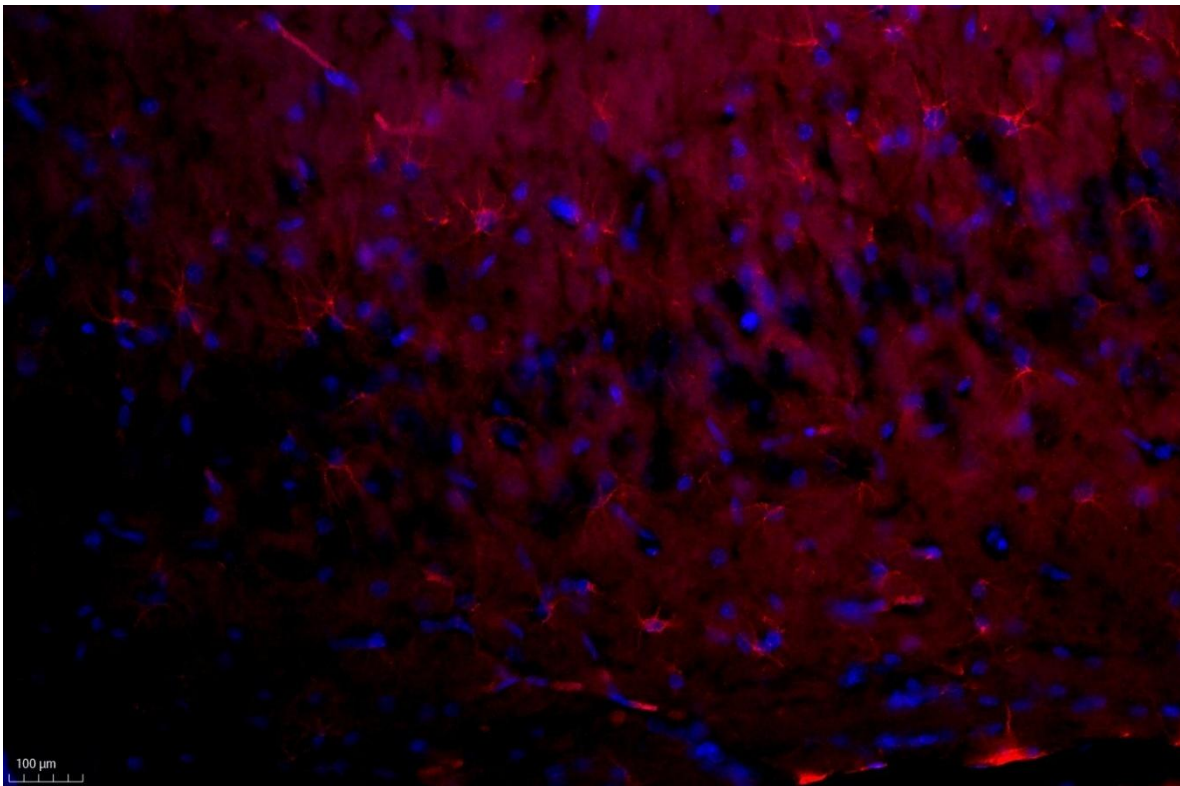
OZDF NG VH GD



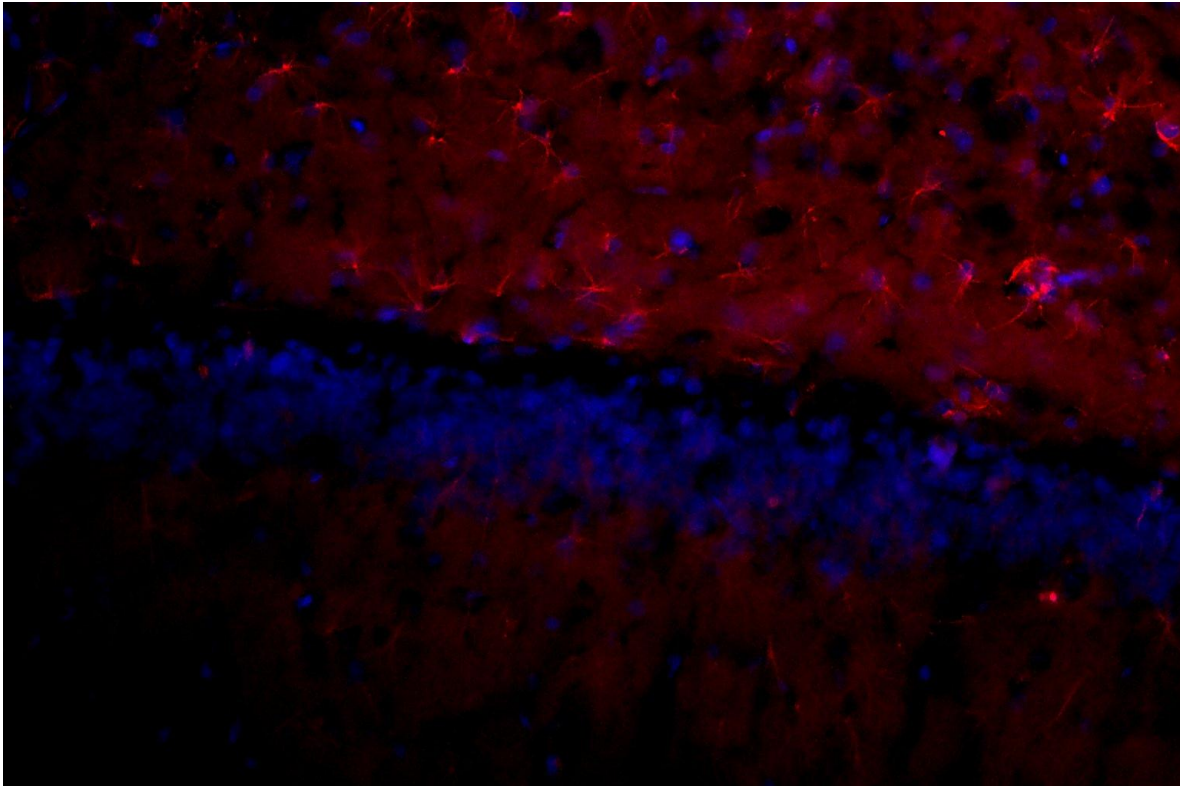
OZDF NG TX CA1



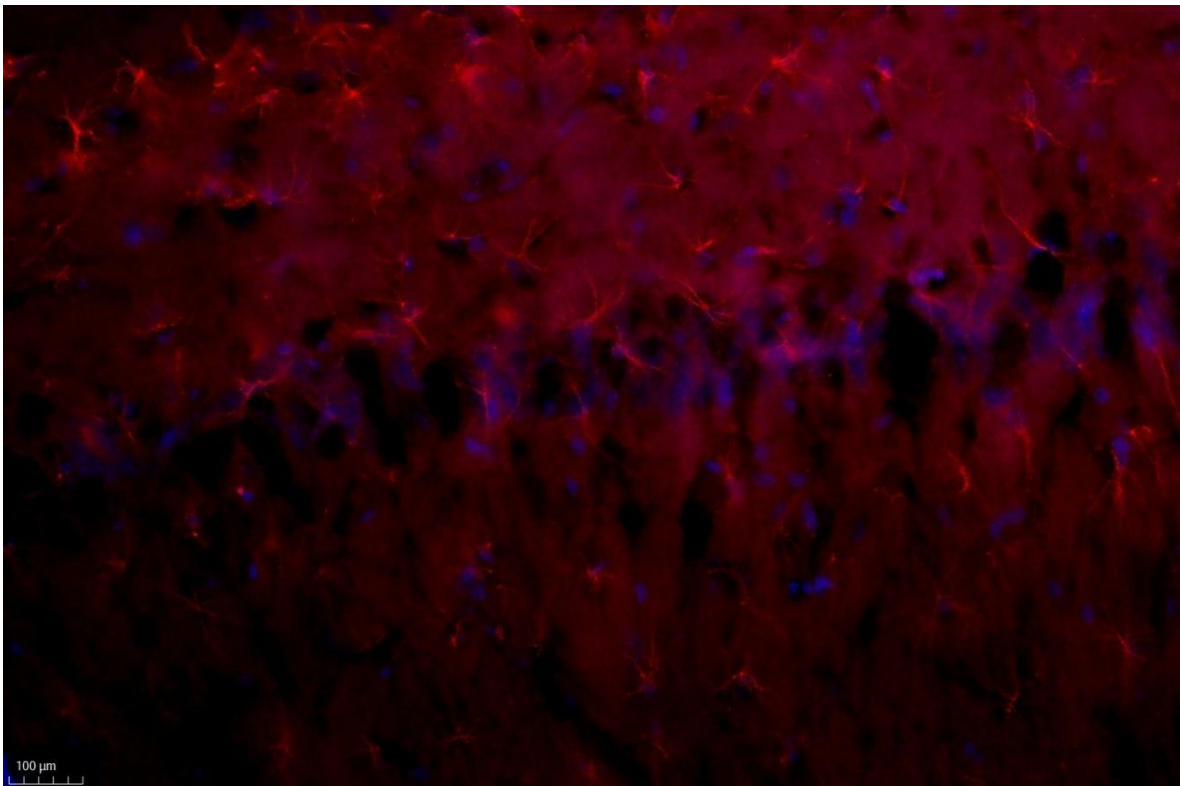
OZDF NG TX CA3



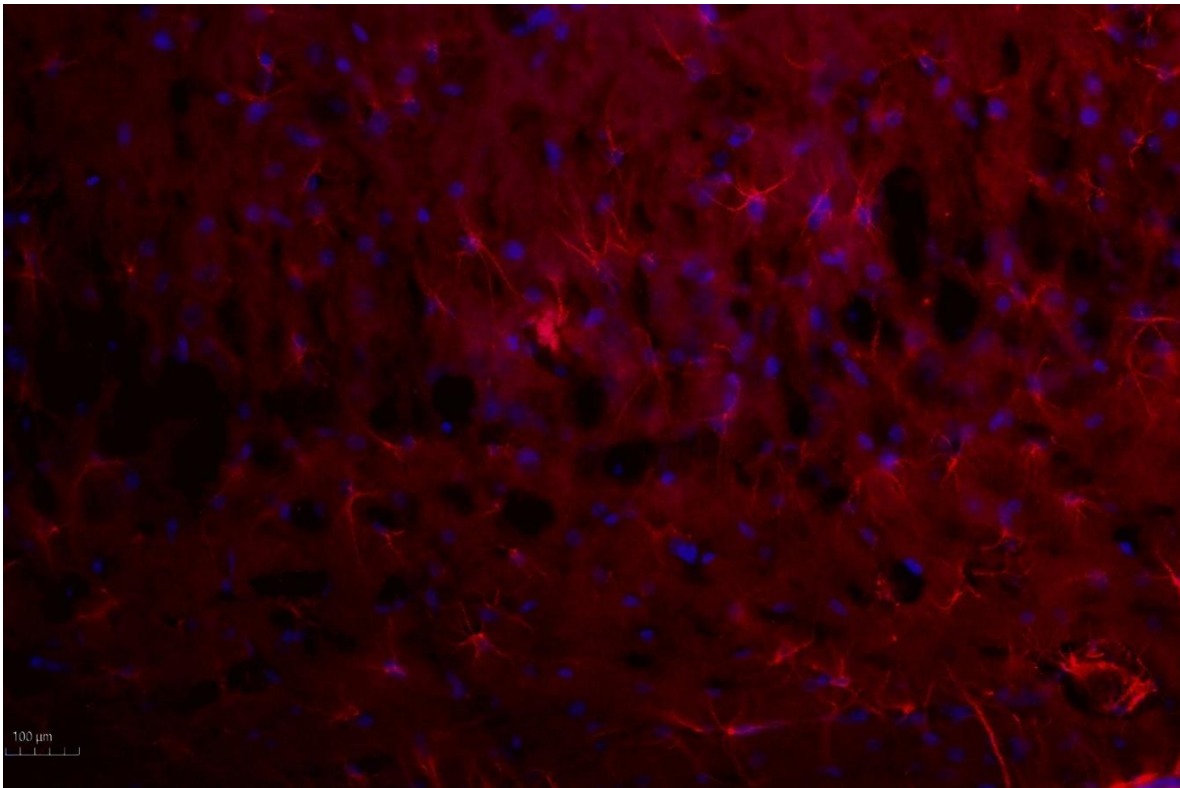
OZDF NG TX GD



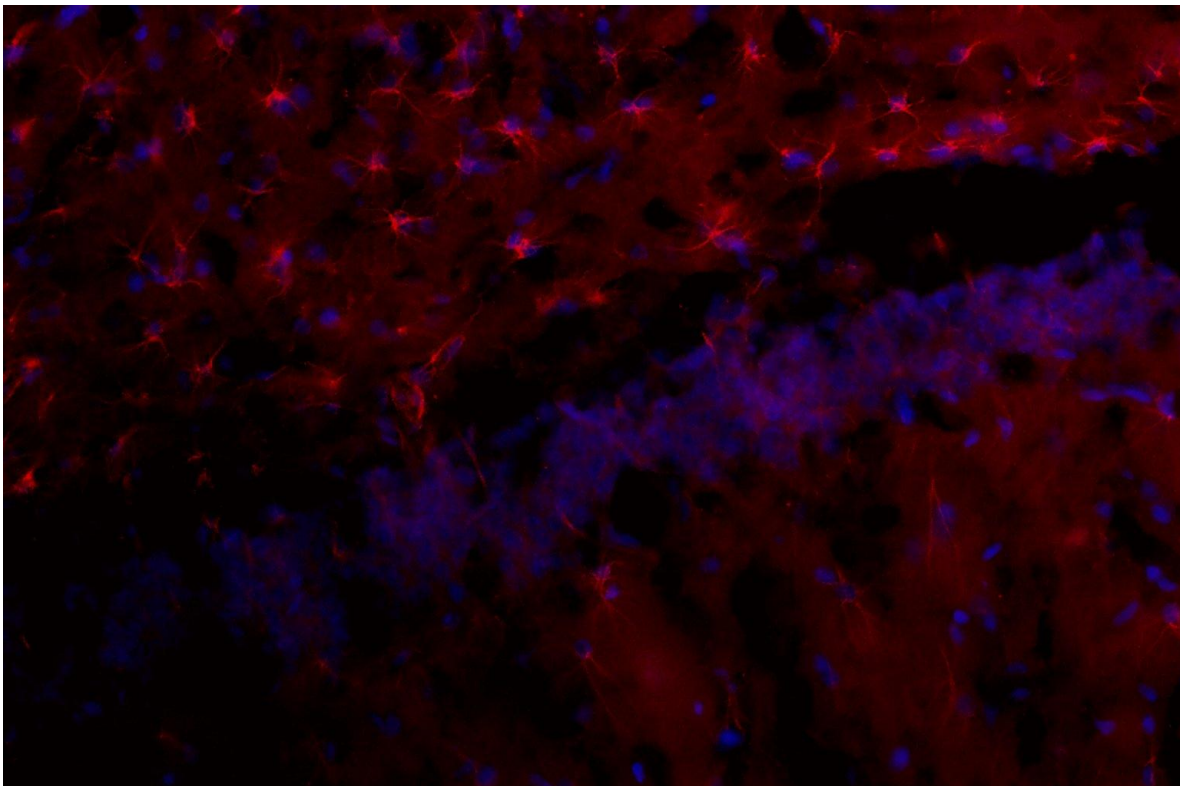
OZDF HG VH CA1



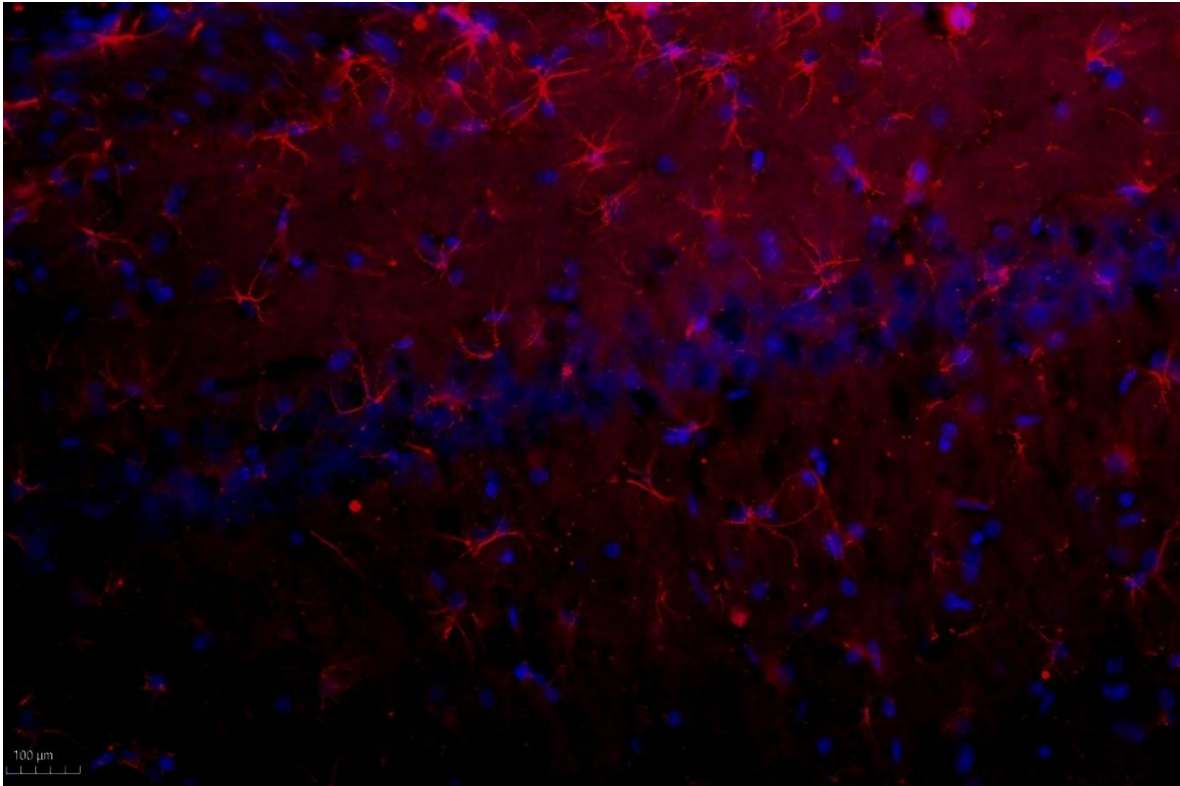
OZDF HG VH CA3



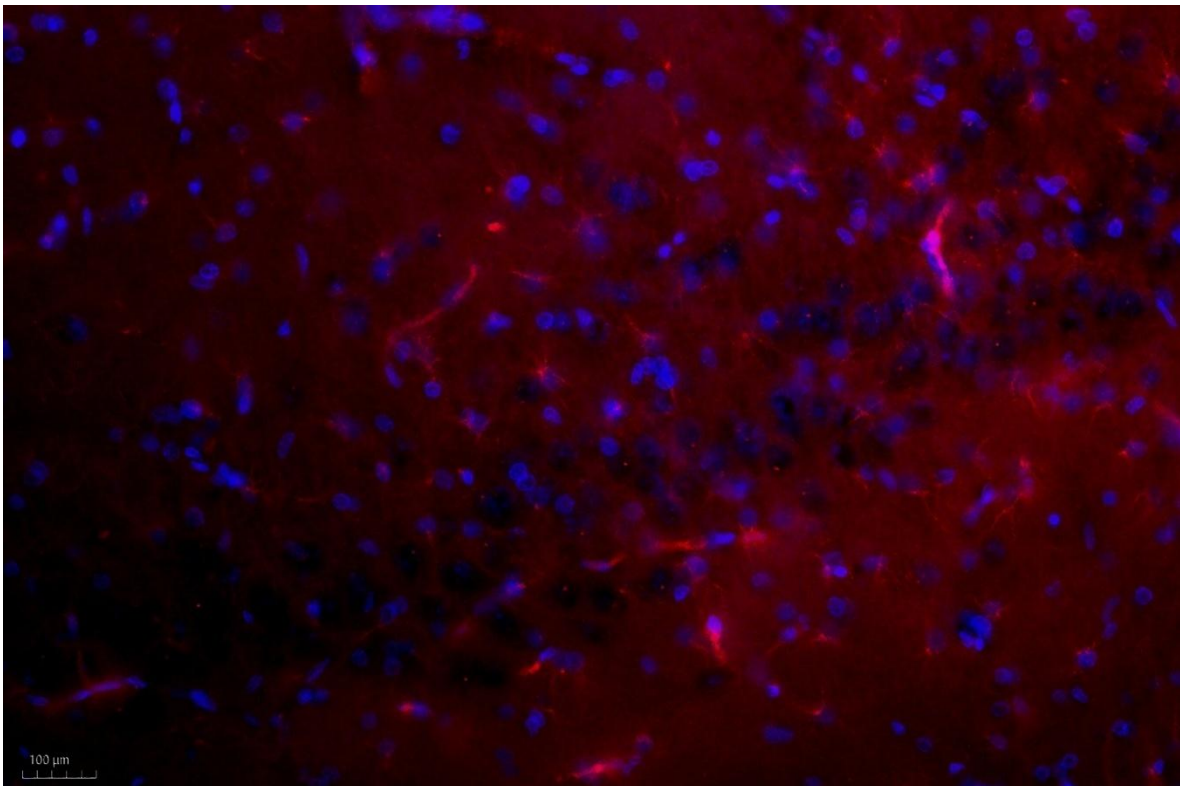
OZDF HG VH GD



OZDF HG TX CA1



OZDF HG TX CA3



OZDF HG TX GD

