



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas

Posgrado en Ciencias Químicas

Maestría en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Laboratorio de Neurofarmacología

Tesis presentada para obtener el grado de Maestría

“Efecto del síndrome metabólico y la administración del péptido amiloide- β_{25-35} sobre la memoria espacial, la expresión de enzimas colinérgicas y del factor de crecimiento nervioso en ratas”

Presenta

QFB Olivia Reyes Castro

Directores de tesis

D.C. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

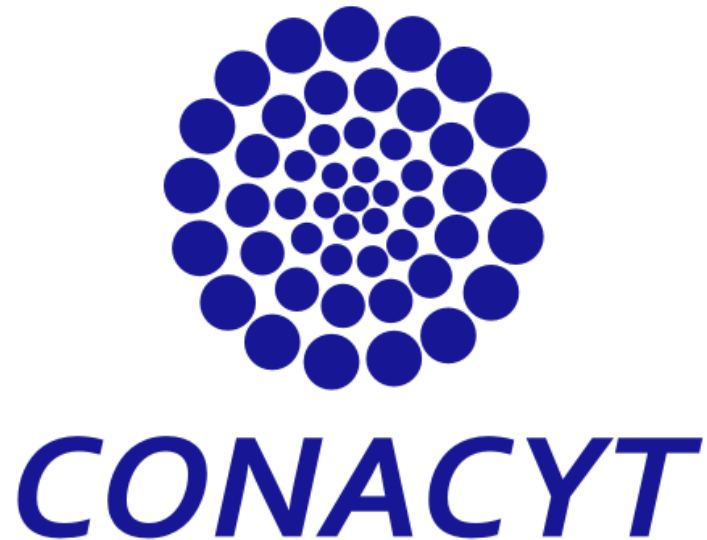
Profesor -investigador Facultad de Ciencias Químicas
Laboratorio de Neurofarmacología

D.C. Aleidy Patricio Martínez

Profesor -investigador Facultad de Ciencias Biológicas
Laboratorio de Neurofarmacología

Noviembre de 2020





La sustentante de presente trabajo contó con el apoyo de la beca-tesis No. 890081 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante el período 2018-2019.

El presente trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto CONACYT 169023 otorgado al D. C. Daniel Limón Pérez de León

Agradecimientos institucionales



La sustentante del presente proyecto perteneció al Posgrado en Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



El presente trabajo fue apoyado parcialmente por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP. Proyecto VIEP 2018-2019.



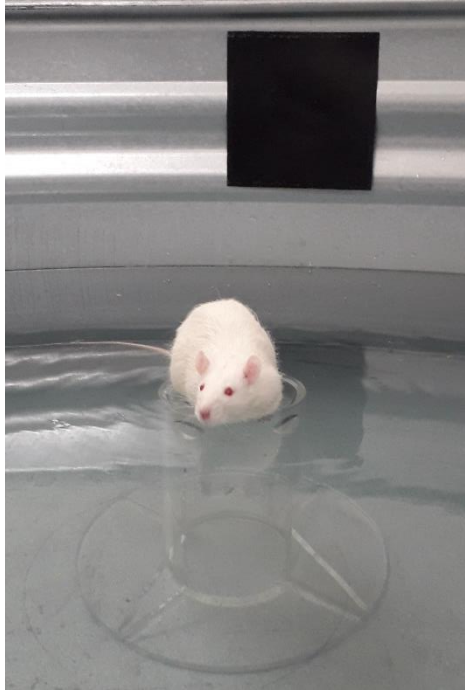
Los experimentos conductuales, las determinaciones bioquímicas e histológicas del presente trabajo se realizaron en el laboratorio de Neurofarmacología.

El desarrollo experimental, el análisis y discusión de los resultados se realizaron bajo la dirección de

D.C. Daniel Limón Pérez de León

y

D.C. Aleidy Patricio Martínez



Los animales utilizados para el desarrollo del presente trabajo fueron facilitados por el Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Agradecimientos

A la comisión revisora del presente trabajo

Por el apoyo otorgado en la revisión de esta tesis, el tiempo dedicado a los comentarios y aportaciones resulta invaluable

Externo mi más grande admiración a su persona

D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta

D.C. Marcia Hiriart Urdanivia

D.C. María del Carmen Parra Cid

M.C. Félix Luna Morales

Al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédicas de Oriente (CIBIOR) por el uso del lector de microplacas bajo la dirección de la D.C. Verónica Vallejo Ruiz.

ÍNDICE	
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen	vi
1. Introducción	1
1.1. El síndrome metabólico	1
1.1.1. Modelos experimentales de síndrome metabólico	5
1.1.2. El consumo de sacarosa como estrategia de inducción a síndrome metabólico ...	9
1.1.3. Mecanismos que participan en el desarrollo de síndrome metabólico por consumo de sacarosa	11
1.2. Deterioro cognitivo en el síndrome metabólico	14
1.2.1. Participación del amiloide β en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer	14
1.2.2. Evidencia experimental de la asociación del síndrome metabólico y el amiloide β	16
1.3. La comunicación colinérgica en la vía septo-hipocampo	17
1.3.1. Neuroquímica y distribución anatómica	17
1.3.2. Participación de la comunicación colinérgica en la navegación	21
1.3.3. Vulnerabilidad colinérgica por dietas hipercalóricas	22
2. Justificación	25
3. Hipótesis	26
3.1. Hipótesis	26
4. Objetivos	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos particulares	26
5. Metodología	27
5.1. Diagrama experimental	27
5.2. Animales de experimentación	28
5.3. Estrategia de inducción al modelo experimental de síndrome metabólico	28
5.3.1. Preparación y administración de la solución de sacarosa al 20%	29
5.3.2. Seguimiento del consumo calórico	29
5.4. Determinación de los parámetros zoométricos	29
5.5. Evaluación del perfil metabólico	30

5.5.1. Evaluación de la curva de tolerancia a la glucosa	30
5.5.2. Obtención de sangre y determinaciones en suero	30
5.6. Cirugía estereotáxica	32
5.6.1. Localización del sitio de administración	32
5.6.2. Preparación de oligómeros de amiloide β_{25-35}	33
5.6.3. Administración en la región CA1 del hipocampo	33
5.7. Protocolo de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris	34
5.7.1. Análisis de las trayectorias de navegación y los mapas de calor	36
5.8. Protocolos para la evaluación inmunohistoquímica por fluorescencia	37
5.8.1. Procesamiento de los cerebros	37
5.8.2. Detección inmunohistoquímica de colina acetiltransferasa, acetilcolinesterasa y del factor de crecimiento nervioso	37
5.8.3. Obtención y análisis de las imágenes por fluorescencia	38
5.9. Análisis estadístico	40
6. Resultados	41
6.1. El consumo de sacarosa produce un modelo experimental de síndrome metabólico ...	41
6.2. El síndrome metabólico no interfiere en el aprendizaje de ratas lesionadas con el péptido $A\beta_{25-35}$	45
6.3. Trayectorias de navegación y los mapas de calor durante el aprendizaje	47
6.4. El síndrome metabólico no exacerba el daño en la memoria producido por el $A\beta_{25-35}$...	50
6.5. El síndrome metabólico más la lesión con el $A\beta_{25-35}$ no incrementó la pérdida de colina acetiltransferasa en la vía septo-hipocampo	52
6.6. El síndrome metabólico incrementó la expresión de acetilcolinesterasa en el <i>septum medial</i>	56
6.7. El síndrome metabólico más la lesión con el $A\beta_{25-35}$ incrementó la expresión del factor de crecimiento en la vía septo-hipocampo	60
7. Discusión	64
8. Conclusiones	68
9. Perspectivas	69
10. Referencias	70
11. Anexos	79
11.1. Información nutricional Rat Diet 5012	80
11.2. Seguimiento de peso y consumo calórico	81
11.3. El síndrome metabólico y la lesión con el péptido $A\beta_{25-35}$ no interfieren en el desempeño de las ratas en el laberinto acuático de Morris	84
11.4. El síndrome metabólico y la lesión con el $A\beta_{25-35}$ no modifica el número de visitas y el tiempo de navegación en la evaluación de la memoria	86

Índice de figuras

Figura 1. Perspectiva histórica del síndrome metabólico	1
Figura 2. Correlación en el consumo de la dieta occidental y el continuo incremento en desordenes metabólicos	5
Figura 3. Características del modelo de SMet inducido por consumo de solución de sacarosa al 20% durante 24 semanas.	10
Figura 4. Mecanismos involucrados en el desarrollo de síndrome metabólico por el consumo de sacarosa	12
Figura 5. Participación de la inflamación y el estrés oxidativo en el síndrome metabólico	13
Figura 6. La dieta enriquecida con sacarosa incrementa marcadores de amiloidosis	16
Figura 7. Representación esquemática de la neurotransmisión colinérgica	18
Figura 8. Representación esquemática de las conexiones recíprocas entre el <i>septum medial</i> y el hipocampo	20
Figura 9. Localización anatómica de las regiones involucradas en la navegación en roedores ...	21
Figura 10. La dieta enriquecida con colesterol daña la actividad colinérgica en rata	23
Figura 11. El consumo de sacarosa al largo plazo produce cambios en la actividad de acetilcolinesterasa	24
Figura 12. Panorama general del protocolo experimental	27
Figura 13. Fórmulas para calcular el consumo calórico	29
Figura 14. Determinaciones zoométricas en rata Wistar	29
Figura 15. Curva de calibración para la determinación de insulina en suero de rata	31
Figura 16. Localización del sitio de lesión	32
Figura 17. Componentes del laberinto acuático de Morris	34
Figura 18. Diseño y elementos del mapa del laberinto acuático de Morris	35
Figura 19. Tipos de mapas generados en ANY-maze para el laberinto acuático de Morris	36
Figura 20. Características del microscopio de fluorescencia	39
Figura 21. Identificación del área con inmunoreactividad a través de máscaras	39
Figura 22. El consumo de sacarosa produce acumulación de tejido adiposo abdominal en rata Wistar	42
Figura 23. La ingesta de sacarosa al 20% durante 180 días produce intolerancia a la glucosa e incrementa los niveles de insulina, glucosa y triglicéridos en suero de ratas Wistar	44
Figura 24. El síndrome metabólico no daña el aprendizaje espacial en ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo	45
Figura 25. Trayectorias de navegación durante el aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris	48
Figura 26. Mapas de calor durante el aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris	49
Figura 27. El síndrome metabólico y la lesión con el $A\beta_{25-35}$ dañan la navegación espacial durante la prueba de memoria	51

Figura 28. El síndrome metabólico no modificó la expresión de ChAT en hipocampo de ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$	53
Figura 29. El síndrome metabólico no modificó la expresión de ChAT en <i>septum medial</i> de ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$	54
Figura 30. El síndrome metabólico no exagera la pérdida de inmunoreactividad a ChAT en ratas lesionadas con el péptido $A\beta_{25-35}$	55
Figura 31. El síndrome metabólico disminuyó la expresión de AChE en la región CA1 del hipocampo de ratas	57
Figura 32. El síndrome metabólico incrementó la expresión de AChE en el <i>septum medial</i> de ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$	58
Figura 33. El síndrome metabólico incrementa el área teñida con inmunoreactividad para AChE en el <i>septum medial</i> de ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$	59
Figura 34. El síndrome metabólico incrementó la expresión de NGF en el hipocampo de ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$	61
Figura 35. El síndrome metabólico no modificó la expresión de NGF el <i>septum medial</i> de ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$	62
Figura 36. El síndrome metabólico más la lesión con $A\beta_{25-35}$ incrementan el área teñida para el NGF en regiones de la vía septo-hipocampo	63
Figura 37. Registro del peso corporal y el consumo calórico total durante todo el protocolo experimental	82
Figura 38. Seguimiento en la ingesta de alimento y agua o solución de sacarosa al 20% durante todo el protocolo experimental	83
Figura 39. El síndrome metabólico y la lesión con el péptido $A\beta_{25-35}$ no intervienen la ejecución del nado en el laberinto acuático de Morris	85
Figura 40. El síndrome metabólico y la lesión con el péptido $A\beta_{25-35}$ no modifica el número de visitas y el tiempo de navegación en el cuadrante blanco	86

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico	3
Tabla 2. Estrategias y modelos de síndrome metabólico en roedores	7
Tabla 2. Estrategias y modelos de síndrome metabólico en roedores (continuación)	8
Tabla 3. Arreglo de anticuerpos primarios y secundarios para la detección por fluorescencia de ChAT, AChE y NGF en cerebro de rata	38
Tabla 4. Comparación de la ingesta calórica al inicio y al término del periodo de inducción	41
Tabla 5. Comparación del perfil zoométrico inicial y al día 180 de tratamiento	42

Abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterasa
A β	Amiloide beta
A $\beta_{1-40, 1-42, 25-35}$	Amiloide beta fracción (1-40, 1-42, 25-35)
ChAT	Colina acetiltransferasa
Col-HDL	Colesterol de alta densidad
GD	Giro dentado
GLUT 2	Transportador de Glucosa de tipo 2
HCHD	Dieta alta en carbohidratos
HFD	Dieta alta en grasas
HF-HCHD	Dieta alta en grasas-dieta alta en carbohidratos
HSD	Dieta alta en sacarosa
IDF	Federación internacional de la diabetes
IMC	Índice de masa corporal
LAM	Laberinto acuático de Morris
NGF	Factor de crecimiento nervioso
WHO	Organización mundial de la salud
PB	Buffer de fosfatos
SMet	Síndrome metabólico
SSI	Solución salina isotónica
STZ	Estreptozotocina
vDBB	Región vertical de la Banda Diagonal de Broca

Resumen

El consumo de bebidas endulzadas es un hábito común en el estilo de vida actual que promueve el desarrollo de síndrome metabólico (SMet). Los reportes clínicos indican que el SMet incrementa hasta dos veces el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer (EA). En la EA el deterioro cognitivo se debe a la acumulación de amiloide β ($A\beta$) en el hipocampo y a la pérdida de la inervación colinérgica que recibe a través de la vía septo-hipocampo. La comunicación septo-hipocampo es funcionalmente recíproca; por un lado las neuronas colinérgicas provenientes del *septum medial* y de la Banda Diagonal de Broca liberan y mantienen los niveles de acetilcolina mediante su síntesis a través de colina acetiltransferasa (ChAT) y su degradación por acetilcolinesterasa (AChE), lo que permite la plasticidad sináptica y la generación de las oscilaciones Theta en el hipocampo, mientras que la síntesis y secreción del factor de crecimiento nervioso (NGF) en el hipocampo, mantiene el fenotipo de las neuronas colinérgicas al transportarse retrógradamente hasta el soma neuronal.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del SMet y la administración intrahipocámpal del péptido $A\beta_{25-35}$ sobre la memoria espacial, la expresión de las enzimas colinérgicas y del NGF en ratas. El modelo experimental de SMet se obtuvo por el consumo de sacarosa al 20% durante 180 días y posteriormente se administraron los agregados del $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo. Los resultados indicaron que el SMet+ $A\beta_{25-35}$ no modificó la latencia al escape en el aprendizaje, sin embargo, su navegación se caracterizó por tigmotaxis y búsqueda aleatoria. En la evaluación de la memoria, la latencia al primer cruce a la zona de la plataforma del grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ fue similar a los grupos SMet o el $A\beta_{25-35}$, aunque las ratas no lograron localizar el sitio exacto donde se localizó la plataforma. El análisis inmunohistoquímico indicó que en el grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ no se exacerbó la pérdida de ChAT en las regiones de la vía septo-hipocampo respecto a los grupos SMet y $A\beta_{25-35}$, sin embargo, la expresión de AChE incrementó en el *septum medial* de las ratas SMet+ $A\beta_{25-35}$, al igual que NGF en las regiones de la vía septo-hipocampo.

Nuestros hallazgos sugieren que la expresión de ChAT y de AChE en regiones de la vía septo-hipocampo son vulnerables a la presencia del SMet, probablemente a causa de mecanismos oxidantes y proinflamatorios, sin embargo al permanecer latente, el SMet también estimulará mecanismos de defensa como la liberación de NGF, que al sintetizarse en hipocampo y transportarse al soma colinérgico, podría evitar la exacerbación del daño que ocasiona la administración de $A\beta_{25-35}$ sobre marcadores colinérgicos y en el aprendizaje y la memoria espacial. Hasta el momento, el presente proyecto es el primero en mostrar evidencia experimental sobre la participación y vulnerabilidad colinérgica de la vía septo-hipocampo en un modelo de SMet, sin embargo es necesario continuar su estudio para esclarecer la implicación de la fisiopatología del SMet sobre los elementos de la neurotransmisión colinérgica y su papel en tareas dependientes del hipocampo.

1. Introducción

1.1. El síndrome metabólico

El concepto de síndrome metabólico (SMet) se ha reconocido por casi 100 años, a través de los cuales se le denominó de distintas maneras; síndrome X, el cuarteto de la muerte, síndrome de afluencia o síndrome de resistencia a la insulina (Sarafidis y Nilsson, 2006) (Figura 1).

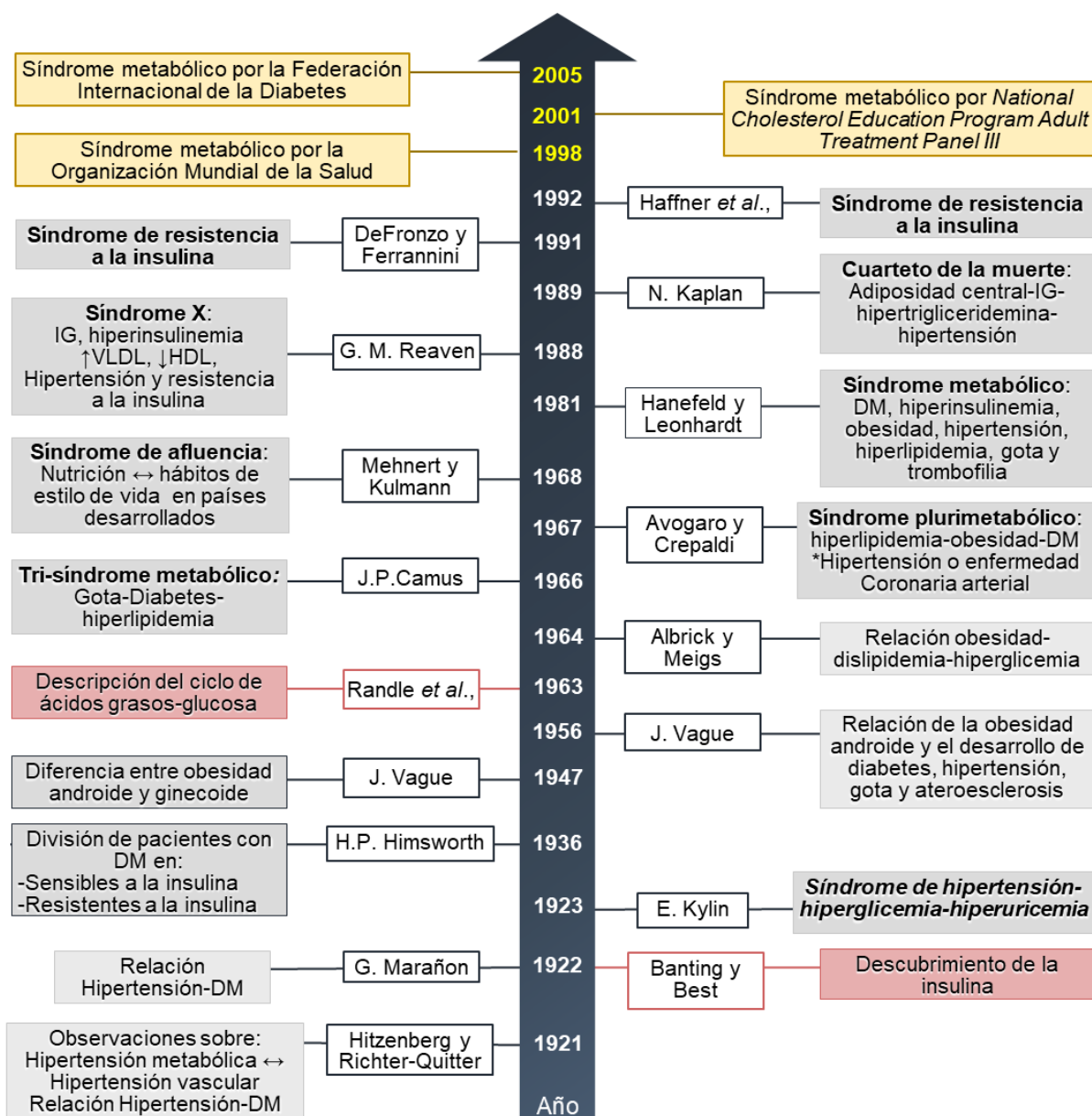


Figura 1. Perspectiva histórica del síndrome metabólico. En la línea del tiempo se muestran los aportes de algunos autores como: observaciones directas y términos utilizados para el síndrome metabólico (cuadros en gris), descubrimientos y descripción de mecanismos importantes en la comprensión de la fisiopatología (cuadros en rojo) y al final se indican los criterios internacionales más utilizados que definen al síndrome metabólico (cuadros en amarillo). ↔: interdependencia, DM: Diabetes Mellitus, *: a veces, IG: Intolerancia a la Glucosa, ↑VLDL: niveles altos de lipoproteínas de muy baja densidad, ↓HDL: niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (modificado de Sarafidis y Nilsson, 2006).

Independientemente del término utilizado, los científicos coincidieron en la identificación de un conjunto de alteraciones metabólicas que coexistían con más frecuencia de lo que se esperaría (hipertensión, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia, etc.) las cuales, al desarrollarse de manera simultánea en un individuo, incrementaban el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Leslie, 2005; Cornier *et al.*, 2008). Aunque se lograron importantes avances en la comprensión del SMet, fue hasta la década de los 90s cuando la atención de los expertos se concentró en agrupar los componentes que definirían al SMet (Figura 1).

En la actualidad, el SMet se define como una condición clínica multifactorial que incluye alteraciones metabólicas y bioquímicas; obesidad abdominal, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipidemia e hipertensión (Eckel *et al.*, 2005). La descripción del SMet ha permitido establecer criterios para su diagnóstico y utilizarlo como indicador de riesgo de enfermedades con causa metabólica; se conoce que un individuo con SMet duplica el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares e incrementa hasta cinco veces la probabilidad de padecer diabetes tipo 2 (Reaven, 2006; Grundy, 2008).

El diagnóstico de SMet se realiza a través de uno de los criterios vigentes a nivel mundial, propuestos por la Organización Mundial de la Salud (WHO), por el tercer reporte del Programa Nacional de Educación en el Colesterol del Panel de Tratamiento en el Adulto (NCEP/ATP III) y por la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) (Tabla 1). Cada criterio se concentró en la patogénesis y consecuencias del SMet (Grundy, 2008). La WHO consideró el riesgo que representa el SMet para el desarrollo de diabetes tipo 2, por lo que en su criterio es fundamental demostrar la resistencia a la insulina en el individuo. El NCEP/ATP III relacionó la contribución de cada componente del SMet en el riesgo cardiovascular e indica que el individuo debe reunir al menos 3 de las cinco condiciones clínicas propuestas, considerando que no hay una causa común para el SMet. En el criterio de la IDF es fundamental la presencia de obesidad abdominal y su determinación debe ajustarse a las diferencias entre el sexo y el grupo étnico del individuo (Reaven, 2006).

Independientemente del criterio que se utilice, la prevalencia del SMet en todo el mundo es elevada, la WHO reporta una prevalencia del 26%, el NCEP/ATP III del 34.6% y la IDF un 39.1% (Grundy, 2008) no obstante, las cifras pueden variar al considerar factores como la edad, el grupo étnico, la raza y el sexo de la población que se estudia (Chew *et al.*, 2006). Respecto a la edad, los reportes epidemiológicos indican que la prevalencia de SMet en adultos mayores de 50 años es del 40-70% (Alexander *et al.*, 2003; Ford, 2005; Grundy, 2008), mientras que en jóvenes-adultos (18-30 años) oscila entre el 5-7% (Nolan *et al.*, 2017). Los datos anteriores indican que el envejecimiento incrementa la probabilidad de padecer SMet, sin embargo, se ha señalado que los

elementos genéticos, ambientales y del estilo de vida contribuyen en mayor medida en el desarrollo de SMet.

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico

WHO (1998)	NCEP/ATP III (2001)	IDF (2005)
<p>Uno de los siguientes parámetros:</p> <p>Diabetes Mellitus Glucosa en ayuno (≥ 126 mg/dL) o glucosa post-carga a las 2 h (≥ 200 mg/dL)</p> <p>Intolerancia a la glucosa Glucosa en ayuno (≥ 126 mg/dL) y glucosa post-carga a las 2 h (≥ 140 mg/dL y < 200 mg/dL)</p> <p>Glucosa en ayuno alterada Glucosa en ayuno (≥ 110 mg/dL y < 126 mg/dL) y glucosa post-carga a las 2 h (< 140 mg/dL)</p> <p>Resistencia a la insulina</p>	<p>Tres de los siguientes parámetros:</p> <p>Glucosa en ayuno (≥ 110 mg/dL)</p> <p>Circunferencia abdominal Hombres: > 102 cm Mujeres: > 88 cm</p> <p>Triglicéridos ≥ 150 mg/dL</p> <p>Colesterol-HDL Hombres: < 40 mg/dL Mujeres: < 50 mg/dL</p> <p>Presión sanguínea $\geq 130/85$ mm Hg</p>	<p>Obesidad central Hombres: ≥ 94 cm Mujeres: ≥ 80 cm Ajustar a valores específicos de acuerdo con el grupo étnico.</p> <p>Más 2 de los siguientes parámetros:</p> <p>Triglicéridos elevados ≥ 150 mg/dL o tratamiento farmacológico para el desorden</p> <p>Disminución en la concentración de Colesterol- HDL: Hombres: < 40 mg/dL Mujeres: < 50 mg/dL o tratamiento farmacológico para el desorden</p> <p>Presión sanguínea elevada Sistólica: ≥ 130 mm Hg y diastólica ≥ 85 mm Hg o tratamiento para hipertensión</p> <p>Glucosa elevada en ayuno ≥ 100 mg/dL o diagnóstico de diabetes tipo 2</p>
<p>Más dos de los siguientes parámetros</p> <p>Índice cintura-cadera: Hombres: > 0.9; Mujeres: > 0.85 IMC > 30 kg/m² o ambos</p> <p>Triglicéridos: ≥ 150 mg/dL</p> <p>Colesterol-HDL < 35 mg/dL en hombres y < 39 mg/dL en mujeres; o ambos</p> <p>Presión sanguínea: $\geq 140/90$ mm Hg</p> <p>Microalbuminuria: (excreción urinaria ≥ 20 μg/min o índice albúmina/creatinina ≥ 30 mg/g)</p>		

La secuencia en que se presentaron los criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico fue en 1998 por la Organización Mundial de la Salud (WHO), en 2001 por el Programa Nacional de Educación en el Colesterol Panel (NCEP/ATP III) y en 2005 por la Federación Internacional de la Diabetes (IDF). *IMC: índice de Masa Corporal; Colesterol-HDL: Lipoproteínas de alta densidad* (modificado de Raven, 2006).

La complejidad y heterogeneidad del SMet sugiere un origen multifactorial, particularmente por factores genéticos y ambientales. La búsqueda de la influencia genética en el SMet ha demostrado que cada uno de sus componentes tiene un principio genético, para los cuales se han identificado algunos genes (Pollex y Hegele, 2006; Janja, 2007).

Respecto a la obesidad abdominal Sutton *et al.*, en 2002, reportaron que los incrementos en el índice de masa corporal (IMC) y en la circunferencia abdominal, correlacionan con la presencia de polimorfismos en el gen *APM1*, que codifica a la adiponectina (*Apm1*; *adipose most abundant transcript*, en humanos) e indicaron que la inserción de una repetición de CA (Citocina-adenina) en el promotor podría incrementar la transcripción de *APM1* y a su vez, los niveles de adiponectina para mantener la homeostasis en el metabolismo de la glucosa y reducir los niveles de triglicéridos en plasma. Mientras que en roedores la disrupción del gen *ADIPOQ* (que codifica a la adiponectina en roedores) resultó en un lento aclaramiento de los ácidos grasos libres en plasma y en el desarrollo de resistencia a la insulina (Maeda *et al.*, 2002). La resistencia a la insulina y la dislipidemia se ha relacionado con el polimorfismo Pro12Ala del Receptor Activador-Proliferador de Peroxisomas- γ 2 (PPAR γ 2) (Carrillo-Venzor *et al.*, 2020). Los resultados de la sustitución de Prolina (alelo mayoritario) en el lugar de Alanina (alelo minoritario) son la disminución en la afinidad al elemento de respuesta (PPRE) y la disminución en la formación del heterodímero PPAR γ 2/RXR α (Receptor a Retinoide X α) evitando la transcripción de genes como adiponectina, necesaria para sensibilización de la insulina y en la homeostasis en el metabolismo de ácidos grasos (Deeb *et al.*, 1998; Gurnell, 2003).

En la última década, a través de los estudios de asociación de genoma (GWAS) completo y la secuenciación de nueva generación se ha logrado identificar una gran variedad de genes asociados a cada elemento del SMet, sin embargo, las diferencias técnicas y la heterogeneidad del propio SMet representan un reto en la descripción de una causa genética homogénea para el SMet (Abou Ziki y Mani, 2016). Estos elementos genéticos permanecerán latentes en el individuo hasta estimularlos mediante los componentes ambientales como la dieta, la escasa actividad física o alteraciones en el ciclo circadiano (Wagner *et al.*, 2012).

Los reportes epidemiológicos muestran una correlación entre el consumo de la “dieta occidental” (alto contenido en grasas saturadas y carbohidratos simples) respecto al continuo incremento en los casos de obesidad y otros desordenes metabólicos (Bray *et al.*, 2004, Cordain *et al.*, 2005; Koop, 2019) (Figura 2). Recientemente se reportó que la obesidad (IMC > 30 kg/m²) contribuye con más de 120 millones de casos de discapacidad laboral en todo el mundo y se relacionó con el 41% de muertes ocurridas en 2015 (GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017). El alcance que puede tener la obesidad y en consecuencia el SMet, representa un reto para el sistema de salud pública y un gran impacto socioeconómico a nivel mundial, de ahí la importancia de estudiar sus causas e implicación desde una perspectiva epidemiológica, clínica y experimental.

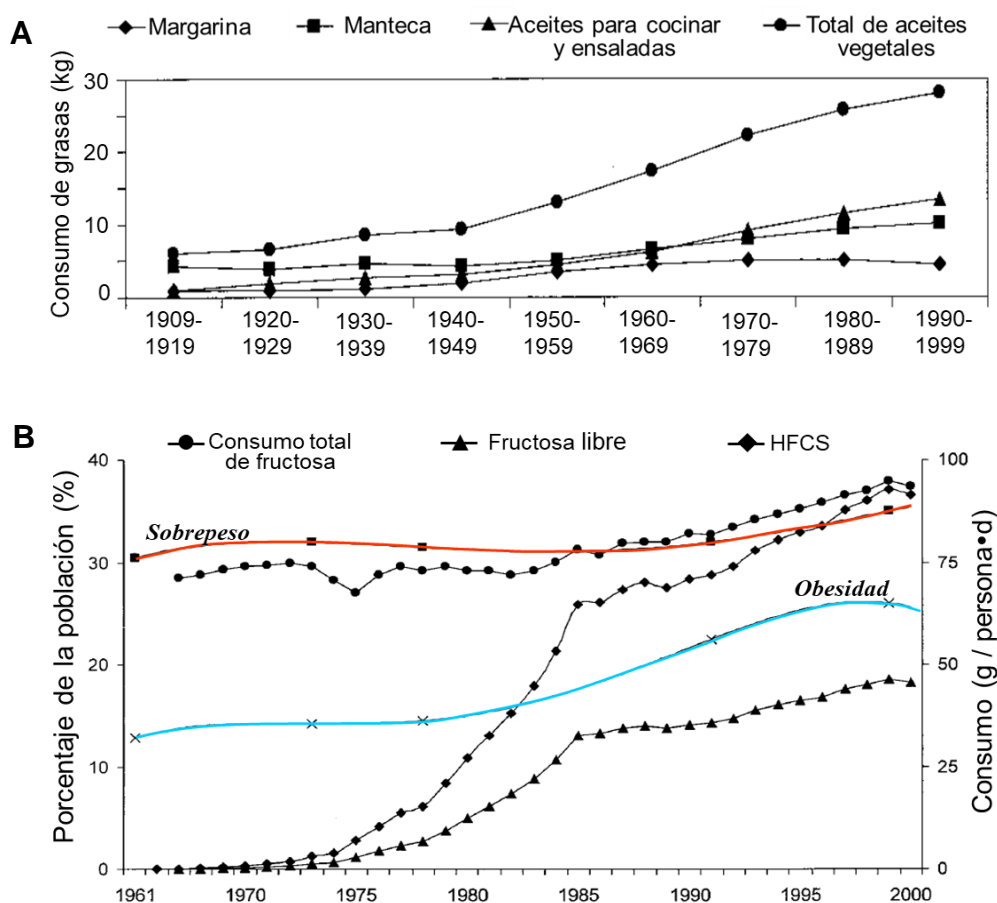


Figura 2. Correlación en el consumo de la dieta occidental y el continuo incremento en desórdenes metabólicos. En **A**) el consumo de diferentes tipos de grasas durante 1909-1999 (modificado de Cordain *et al.*, 2005). En **B**) se muestra la relación de la población y su consumo de endulzantes (g/ persona*día) con los casos de sobrepeso (línea naranja) y obesidad (línea azul) durante 1961-2000. HFCS; Jarabe de alta fructosa (modificado de Bray *et al.*, 2004).

1.1.1. Modelos experimentales de síndrome metabólico

Un modelo experimental de SMet debe representar las características fisiopatológicas que se observan en los humanos. El creciente interés por comprender los mecanismos fisiopatológicos del SMet, ha impulsado el desarrollo de modelos experimentales en diferentes modelos animales; conejos, perros, cerdos y primates no humanos, sin embargo, los roedores son los más utilizados (Arias-Mutis *et al.*, 2018). Los modelos de SMet en rata o ratón se obtienen a través de modificaciones genéticas, lesiones o tratamientos farmacológicos o por manipulación de la dieta (Pachal y Brown, 2011; Wong *et al.*, 2016). En la tabla 2 se mencionan algunos métodos y modelos representativos de cada estrategia.

Entre los modelos genéticos, los roedores con deficiencia de leptina o de su receptor son los más utilizados. La disminución de los niveles de leptina y el cambio en la señalización a través del receptor, promueven la hiperfagia y eventualmente el desarrollo de obesidad, hiperinsulinemia y dislipidemia en ratones y ratas (Tabla 2). En un animal mutante las alteraciones metabólicas se desarrollan a temprana edad (a partir de las 3 semanas de edad) y se deterioran rápidamente a medida que el roedor madura, por lo que se dificulta establecer una temporalidad en que los roedores desarrollen SMet, además de ser utilizados para el estudio de diabetes tipo 2. Por otro lado, aunque la investigación de expresión de genes es importante para la comprensión genética en el SMet, la mutación de leptina o del receptor a leptina raramente ocurre en humanos (Wong *et al.*, 2016).

La administración de estreptozotocina (STZ) en roedores es la estrategia farmacológica más utilizada para reproducir algunas características fisiopatológicas de la diabetes tipo 1 que se observa en humanos (Rakieten *et al.*, 1963). La STZ es un análogo de la glucosa que provoca la necrosis de la célula β pancreática y con ello un estado de insulinoopenia. La STZ se absorbe de manera específica por el transportador de glucosa de tipo 2 (GLUT2) y una vez incorporada genera una molécula de metilnitrosourea, cuya propiedad alquilante le permite transferir un grupo metilo en O⁶ de la guanina, desencadenando mecanismos de reparación que agotan las reservas energéticas y finalmente ocurre la fragmentación del ADN (Lenzen *et al.*, 2008). La administración de STZ a dosis >50-100 mg/kg produce un modelo de diabetes tipo 1 (Damasceno *et al.*, 2014) sin embargo, se ha mostrado que a una dosis baja de STZ (25-40 mg/kg i.p.) se produce una pérdida parcial de células β que, en conjunto con la exposición a una dieta enriquecida con lípidos, se logra reproducir un modelo de obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Skovso, 2014) (Tabla 2). Los protocolos de administración de STZ se modifican constantemente en dependencia a la cepa del roedor o a la vía de administración seleccionada, además es importante considerar que la STZ también ejerce un efecto tóxico en el hígado el riñón, así como carcinogénico (Kleint *et al.*, 2018).

Tabla 2. Modelos de síndrome metabólico en roedores

Estrategia	Modelos	Cambios metabólicos	Referencias
Genético	C57BL/6J - <i>Lep^{ob/ob}</i> (m)	De elección para obesidad y diabetes Desarrollan obesidad, hiperinsulinemia e hiperglicemia > 38 semanas de edad pueden desarrollar hipertensión y dislipidemia	Dubuc, 1976 Van de Bergh <i>et al.</i> , 2008
	C57BL/6J- <i>Lep^{db/db}</i> (m)	De elección para obesidad y diabetes > 6 semanas de edad desarrolla obesidad, hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, dislipidemia	Ae Park <i>et al.</i> , 2006 Dong <i>et al.</i> , 2010
	POUND™ (C57BL/6J- <i>Lep^{db/lb}</i>)	De elección para obesidad y SMet >4 semanas de edad desarrollan obesidad > 14 semanas desarrollan hipercolesterolemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia y presenta niveles altos de leptina	Baldwin <i>et al.</i> , 2011
	Titan (m)	De elección para SMet y envejecimiento Tienen una vida media de 4 meses	De-Diego <i>et al.</i> , 2020
	Zucker Fatty (r) y Zucker Diabetic Fatty (r)	De elección para SMet 3-5 semanas de edad desarrollan obesidad, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hiperglicemia > 12 semanas de edad desarrollan hipercolesterolemia, hipertriglicéridemia e hipertensión	Leonard <i>et al.</i> , 2005 Lehnen <i>et al.</i> , 2013
	DahlS- <i>Lep^{fa}/Lep^{fa}</i> (r)	De elección para obesidad y SMet >11 semanas de edad desarrollan hipertensión >18 semanas de edad desarrollan obesidad, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia e hipertriglicéridemia	Hattori <i>et al.</i> , 2011 Murase <i>et al.</i> , 2012
	Rata hipertensa espontánea obesa (Koletsky, r)	De elección como modelo de hipertensión >4 semanas de edad desarrollan hipertensión severa >12 semanas de edad desarrollan hiperinsulinemia y resistencia a la insulina	Dickhout y Lee, 1998
	Goto-Kakazaki no obesa (r)	De elección para diabetes tipo 2 > 4 semanas de edad desarrollan hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hiperlipidemia	Goto, Kakizaki y Masaki, 1976

Continuación de tabla 2. Modelos de síndrome metabólico en roedores

Estrategia	Modelos	Características de la estrategia y cambios metabólicos	Referencias
Farmacológica y mecánica	Estreptozotocina y alloxan (m y r)	Produce la pérdida parcial de células β (afinidad GLUT2) a dosis únicas o múltiples de 25-40 mg, i.p. (dosis bajas) Presentan hipoinsulinemia y concentraciones elevadas de glucosa y triglicéridos	Pachal y Brown, 2011
	Lesión (VMH) (r)	Se utiliza la ablación de los axones hacia el VMH, la estimulación con electrodos y la inyección de bloqueadores (procaína) Desarrollan hiperfagia, obesidad e incremento en los niveles de leptina	King, 2006 Kleinert <i>et al.</i> , 2018
	Glucocorticoides (m y r)	Estimulan la lipólisis, gluconeogénesis y proteólisis (mTORC1→p-IRS1→resistencia a insulina)	Fransson <i>et al.</i> , 2013
	Antipsicóticos (m y r)	El tratamiento incrementa la incidencia de SMet Desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina	Morgan <i>et al.</i> , 2014 Wu <i>et al.</i> , 2014
Dieta	Enriquecidas con grasas (m y r)	Contienen grasas saturadas y/o colesterol de a 20-60% Tratamiento durante 10-24 semanas Desarrollan obesidad, hiperglicemia, hipertensión y dislipidemia	Dobrian <i>et al.</i> , 2000 Ghibaudi <i>et al.</i> , 2002 Gallou-Kabani <i>et al.</i> , 2007 Davidson <i>et al.</i> , 2011
	Enriquecidas con carbohidratos (m y r)	Contienen sacarosa del 10-32% en el alimento o en solución Tratamiento durante 8-39 semanas Contienen fructosa de 10-60% en el alimento o en solución Tratamiento durante 8-16 semanas Desarrollan obesidad, hiperglicemia, hipertensión y dislipidemia	Aguilera <i>et al.</i> , 2004; Vasanji <i>et al.</i> , 2006; Larqué <i>et al.</i> , 2011; Velasco <i>et al.</i> , 2012; Mansour <i>et al.</i> , 2013; Mahmoud y Elshazly, 2014, Mamikutty <i>et al.</i> , 2014
	Alto contenido en grasas +carbohidratos simples (m y r)	Contienen carbohidratos -grasas Tratamiento durante 14-16 semanas Contienen grasas-fructosa, colesterol -fructosa Tratamiento durante -32 semanas Grasas-sacarosa Tratamiento durante 4-48 semanas Desarrollan obesidad, hiperglicemia, hipertensión y dislipidemia	Poudyal <i>et al.</i> , 2010 Yang <i>et al.</i> , 2012 Dissard <i>et al.</i> , 2013 Barrios-Ramos <i>et al.</i> , 2014 Zhou <i>et al.</i> , 2014 Hao <i>et al.</i> , 2015 Treviño <i>et al.</i> , 2015
	Dieta de cafetería (r)	Alimentos procesados + solución sacarosa 12% Tratamiento durante 3 semanas Desarrollan obesidad, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa e hipertriglicéridemia	Gomez-Smith <i>et al.</i> , 2016

Se muestra la clasificación de métodos para inducción a síndrome metabólico y modelos experimentales representativos para cada grupo. *m*: ratón; *r*: rata; SMet: Síndrome metabólico, GLUT2: transportador de glucosa 2; VMH: hipotálamo ventromedial.

De acuerdo con la tabla anterior, la inducción a SMet mediante dietas enriquecidas con lípidos (ácidos grasos saturados y colesterol) y carbohidratos simples (sacarosa, glucosa y fructosa) es la más utilizada, debido a que asemeja el consumo excesivo de calorías mientras se desarrollan gradualmente los componentes del SMet. Las dietas para inducir SMet pueden agruparse en función del macronutriente que se incorpora, es decir; dieta alta en lípidos (HFD, del inglés High Fat Diet), dieta alta en carbohidratos (HCHD, del inglés High Carbohydrate Diet) y dieta alta en lípidos y carbohidratos (HF-HCHD, del inglés High Fat-High Carbohydrate Diet), cuyo contenido oscila entre un 10% y hasta un 60%, lo que refleja la diversidad de dietas hipercalóricas (Tabla 2).

Lo anterior señala que la selección de un tipo de dieta es fundamental en la obtención del modelo, a lo que se suma la edad de inicio a la inducción, el periodo de exposición, la cepa y el sexo de los animales (Rodríguez-Correa *et al.*, 2020). En términos de eficiencia, se ha observado una diferencia en la susceptibilidad para desarrollar SMet entre los roedores, por un lado, los ratones tienden a desarrollar características del SMet cuando consumen lípidos, mientras que las ratas lo desarrollan al ingerir carbohidratos simples (Chen *et al.*, 2011).

1.1.2. El consumo de sacarosa como estrategia de inducción a síndrome metabólico

A partir de los estudios prospectivos, en los que se analizó durante un período de tiempo la frecuencia en el consumo de bebidas endulzadas, y la evidencia clínica que correlaciona este hábito con el desarrollo de obesidad, SMet y diabetes tipo 2 (Dhingra *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Malik y Hu, 2015; Ruanpeng *et al.*, 2017), confirman la idea de emplear fructosa, glucosa e incluso sacarosa como componentes esenciales para desarrollar un modelo experimental de SMet.

Originalmente, Kanarek y Orthen-Gambill (1982) observaron que las ratas que consumen sacarosa en solución al 32%, acumulan más tejido adiposo y desarrollan intolerancia a la glucosa respecto al grupo que consume sacarosa granulada. En estudios más recientes, se ha reportado que un tratamiento similar; consumo de solución de sacarosa al 30%, promueve el desarrollo de algunas de las siguientes alteraciones metabólicas; incremento en los niveles de insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol total y ácido úrico (Kawasaki *et al.*, 2001; Novelli *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011), sin embargo, la detección simultánea de al menos tres alteraciones metabólicas es necesaria para describir al SMet en el roedor y dependerá en gran medida del tiempo de exposición a la dieta. Al respecto, se ha reportado que el consumo de solución de sacarosa al 20% durante 8 semanas, genera las características necesarias para establecer un modelo de SMet en ratas Wistar (Larqué *et al.*, en 2011), cuyas características metabólicas (desarrollo de obesidad, incremento en la concentración de triglicéridos, glucosa e insulina, intolerancia a la glucosa y aumento en la presión

sanguínea) son más evidentes después de mantener el mismo tratamiento durante 24 semanas (Velasco *et al.*, 2012, Figura 3).

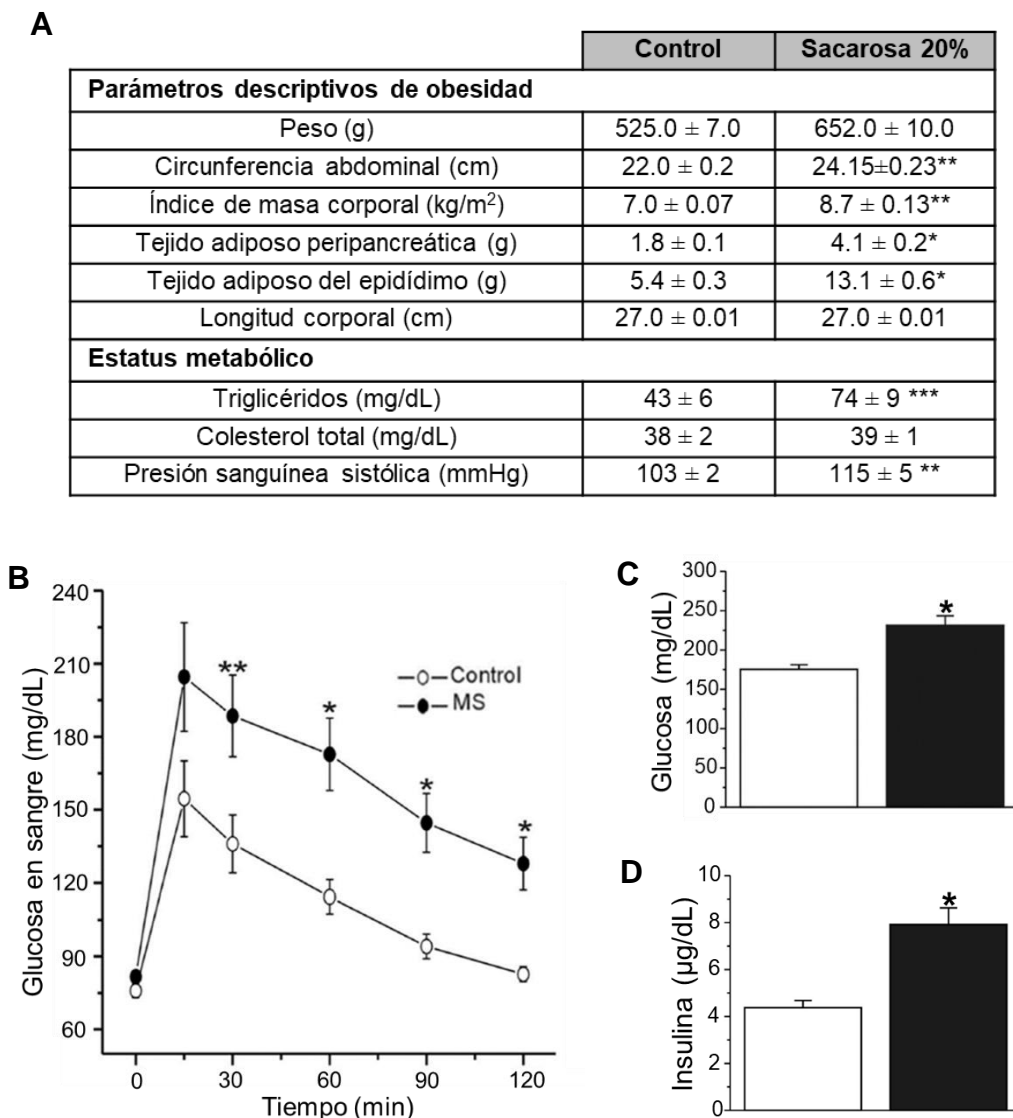


Figura 3. Características del modelo de SMet inducido por consumo de solución de sacarosa al 20% durante 24 semanas. En **A** se muestran las determinaciones que indican obesidad, el incremento en la concentración de triglicéridos en plasma y la presión sistólica en el grupo SMet respecto al grupo Control. El modelo de SMet mostró intolerancia a la glucosa (**B**) y niveles elevados de glucosa (**C**) e insulina (**D**) en plasma. Los datos representan el promedio ± EEM, se analizó con ANOVA de una vía, considerando * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al Control (modificado de Velasco *et al.*, 2012).

1.1.3. Mecanismos que participan en el desarrollo de síndrome metabólico por el consumo de sacarosa

El desarrollo y progresión del SMet a causa del alto consumo de sacarosa implica en principio, la estimulación constante de las vías metabólicas que siguen la glucosa y la fructosa. Posterior a la ingesta, la sacarosa es hidrolizada por la sacarosa-isomaltasa y se liberan glucosa y fructosa, ambos monosacáridos se incorporan al enterocito a través de sus transportadores específicos; el cotransportador de sodio-glucosa (SGLT-1) y el transportador GLUT5, respectivamente. Una vez en el enterocito, la fructosa se metaboliza a través de enzimas específicas generando precursores lipídicos utilizados en la síntesis de triglicéridos y su empaquetamiento en quilomicrones o bien, al igual que la glucosa se libera al torrente sanguíneo para utilizarse como nutriente en los tejidos extrahepáticos o incorporarse a través del GLUT2 a los hepatocitos (Lecoultre y Tappy, 2013, Figura 4).

En el hepatocito, la glucosa es fosforilada por una hexocinasa generando glucosa-6-fosfato (G6P) y seguir la vía glucolítica en la que se genera fructosa-6-fosfato y triosas-fosfato. La conversión de G6P a fructosa-1,6-difosfato a través de la fosfructocinasa es una reacción clave, debido a que su inhibición por el incremento de ATP y citrato regula el estatus metabólico en el hígado y permite que la glucosa en circulación funcione como sensor en el control de la ingesta calórica además de estimular la secreción de insulina. En contraste, la fructosa no estimula la secreción de insulina y su conversión a fructosa-1-fosfato por la fructocinasa, no es un paso regulado, por lo que se mantiene activa la vía glucolítica y se generan constantemente dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (G3P), moléculas precursoras para la lipogénesis y gluconeogénesis (Bizeau y Pagliassotti, 2005). Mientras que la lipogénesis hepática a partir de la fructosa favorece la producción y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Iizuka, 2017, figura 4).

En los adipocitos, los ácidos grasos liberados a partir de las VLDL por acción de la lipasa de lipoproteínas (LPL) son capturados y almacenados, lo que a su vez produce la hipertrofia de los adipocitos y favorece la resistencia a la insulina. A este nivel, la resistencia a la insulina no inhibe la lipólisis por lo que estimula la liberación de ácidos grasos (FFA) al torrente sanguíneo y estos últimos son capturados y almacenados por en el hígado y el músculo. A medida que incrementa el almacenamiento de lípidos en adipocitos, se estimula la secreción de múltiples moléculas para modular el metabolismo de triglicéridos y FFA, además de incrementar la síntesis y liberación de adipocinas como la proteína de quimioatracción a monocitos de tipo 1 (MCP-1) o el Factor de necrosis tumoral α (TNF α), los cuales median la infiltración de macrófagos al tejido adiposo (Guilherme *et al.*, 2008, figura 4).

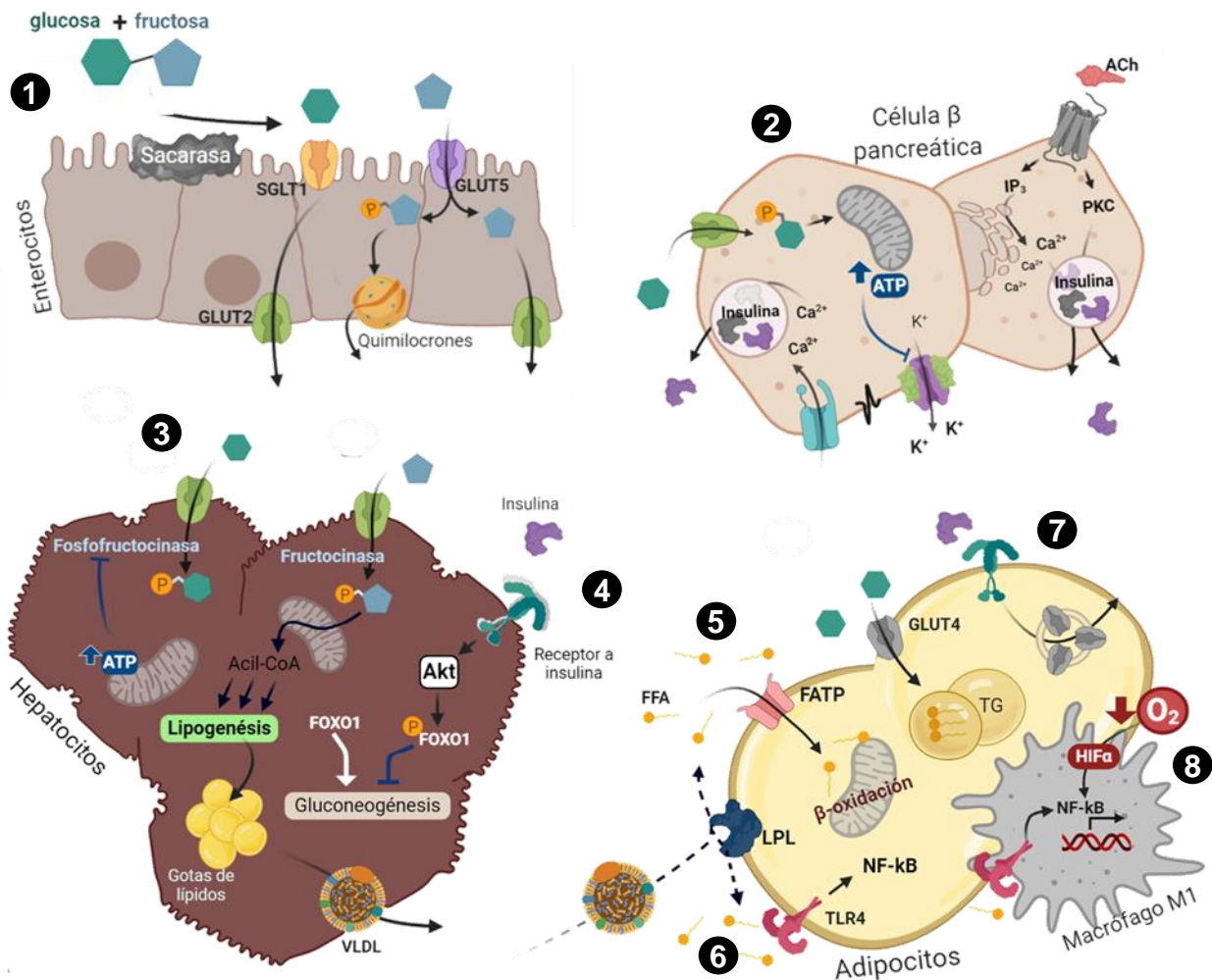


Figura 4. Mecanismos involucrados en el desarrollo de síndrome metabólico por el consumo de sacarosa. El metabolismo de la sacarosa inicia en el intestino delgado (1), en donde se liberan la glucosa y la fructosa por la actividad de la sacarasa. La fructosa puede ser metabolizada en el enterocito para generar precursores lipídicos útiles en la síntesis de los quilomicrones, además ambos monosacáridos se incorporan al torrente sanguíneo. El consumo de sacarosa estimula la secreción de insulina por la célula β pancreática (2) mediante la acción de ACh liberada por el nervio vago o por el incremento en la concentración de glucosa en sangre. En el hepatocito (3), la incorporación de la glucosa se regula por inhibición de la fosfofructocinasa por el incremento en los niveles de ATP, mientras que la captura de fructosa no es regulada y su constante metabolismo estimula la lipogénesis de *novo*, lo que eventualmente promueve el transporte de lípidos mediante VLDL. En hígado, la insulina (4) modula la gluconeogénesis. En los adipocitos (5) la actividad de la LPL conduce a la incorporación, metabolismo y almacenamiento de los FFA. Al desarrollarse la resistencia a la insulina se promueve la liberación de los FFA que activan a TLR4 y se promueve la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias (6) y se compromete la traslocación de GLUT-4 (7). La hipertrofia de los adipocitos produce hipoxia e infiltración de macrófagos de tipo 1 que activan a HIF-1 α (8). SGLT-;Transportador de glucosa/sodio tipo 1, GLUT2, GLUT4, GLUT5;Transportador de glucosa tipo 2, 4 y 5; ACh; Acetilcolina, FOXO; Forkead box protein O1, Akt; Proteína Cinasa B, ATP; Adenosín Trifosfato, VLDL; lipoproteínas de muy baja densidad, IP₃;Inositol trifosfato; FFA; Ácidos grasos libres, LPL; Lipoproteína lipasa, TLR4; Receptor Toll-like 4, FATP; Proteína de transporte de ácidos grasos, PKC; Proteína Cinasa C; NF- κ B; Factor Nuclear κ B, TG; Triglicéridos, HIF-1 α ; Factor inducible por hipoxia 1 α , O₂: Oxígeno molecular (modificado de Lecoultre y Tappy, 2013; Lusting y Gugliucci, 2020).

En el modelo experimental de SMet, el desarrollo de obesidad es el resultado del desequilibrio metabólico por la estimulación constante del metabolismo de la sacarosa, lo que a su vez desencadena la resistencia a la insulina, la dislipidemia e inclusive se modifica la respuesta antioxidante, lo que eventualmente ocasiona un ambiente de estrés oxidativo (EO) y pro-inflamación (Furukawa *et al.*, 2004, Novelli *et al.*, 2007, figura 4).

El SMet se ha descrito como una condición de inflamación crónica de bajo grado, debido a la estimulación constante en la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios por los adipocitos y los macrófagos. Algunos mecanismos involucrados son el transporte de los FFA a través de CD36 y el reconocimiento de TNF α e interleucina 1 β (IL-1 β) a través de los receptores Toll-Like (TLR), los cuales activan al Factor Nuclear- κ B (NF- κ B) y a la Proteína activadora-1 (AP-1) de modo que la respuesta inflamatoria se mantiene y a su vez se media por la síntesis de las mismas citocinas (Figura 5). Se ha reportado que la principal fuente de EO es el tejido adiposo, debido a que los adipocitos hipertroficados presentan un incremento en de la expresión de la NAPH oxidasa, la enzima que convierte al O₂ en ion super óxido (O^{•-}), además de que disminuyen las defensas antioxidantes como la expresión y actividad de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (Olesfsky y Glass, 2010; Matsuda y Shimomura, 2013, figura 5).

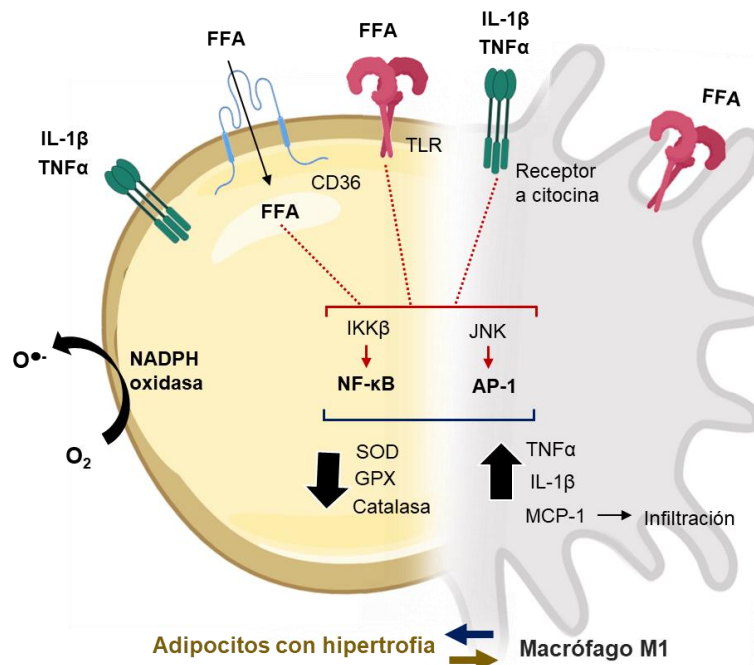


Figura 5. Participación de la inflamación y el estrés oxidativo en el síndrome metabólico. Las citocinas pro-inflamatorias, las especies reactivas de oxígeno y algunos lípidos estimulan la síntesis y liberación de los factores proinflamatorios en adipocitos y de mediadores de quimioatracción que generan la infiltración de macrófagos al tejido adiposo. FFA; Ácidos grasos libres, TLR; Toll-like Receptor, IL-1 β ; Interleucina -1 β , JNK; Cinasa N-terminal c-Jun, IKKB; Inhibitor of Nuclear Factor κ -B Kinase Subunit Beta; NF κ B; Nuclear Factor κ B, TNF α ; Tumor Necrosis Factor α , MCP-1; Monocyte Chemoattractant protein-1. SOD; Superoxide Dismutase, GPX; Glutathione Peroxidase (modificado de Lumeng y Saltiel, 2011; Matsuda y Shimomura 2013).

El consumo de dietas con alto contenido calórico no solo promueve el desarrollo de obesidad o SMet, también se ha asociado con el riesgo de demencia, particularmente con el desarrollo de características fisiopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Whitmer *et al.*, 2005, Yaffe, 2007, Razay *et al.*, 2007).

1.2. Deterioro cognitivo en el síndrome metabólico

En las últimas décadas se observó a las enfermedades metabólicas y neurodegenerativas como condiciones clínicas independientes, desde su etiología hasta distintas consecuencias, sin embargo, esta perspectiva aislada está cambiando. Actualmente, la evidencia clínica que vincula al SMet como un factor de riesgo o como condición clínica que potencia la neuropatología de la EA, ha incrementado importantemente. Se conoce que la EA tiene una elevada prevalencia en países con el mayor consumo de la “dieta occidental” (Panza *et al.*, 2004) y que el incremento en el IMC o el desarrollo de resistencia a la insulina, producto del consumo excesivo de calorías, correlaciona positivamente con deterioro cognitivo, característico de la EA (Whitmer *et al.*, 2005, Yaffe, 2007, Razay *et al.*, 2007), inclusive se ha reportado que el SMet incrementa en 2.4 veces el riesgo de desarrollar EA (Vanhanen *et al.*, 2006), en la que se describen dos hipótesis que dirigen dicha neuropatología; 1) la hipótesis amiloidogénica y 2) la hipótesis colinérgica.

1.2.1. Participación del amiloide β en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

La EA es la principal causa de demencia y afecta a una de cada nueve personas mayores de 65 años (Alzheimer’s Association, 2016). El diagnóstico clínico de la EA emplea criterios cognitivos para establecer el deterioro de las habilidades y se complementan con evaluaciones de neuroimagen o biomarcadores para una detección temprana, sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere del análisis histológico en la autopsia (Gustaw-Rothenberg *et al.*, 2010). Los marcadores neuropatológicos más sobresalientes de la EA son; la neurodegeneración, la acumulación anormal de la proteína Tau hiperfosforilada en el soma neuronal y la presencia de placas amiloides formadas en neuronas y vasos sanguíneos en la corteza cerebral, el hipocampo el lóbulo frontal y en el cerebro basal anterior (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016)

Las placas amiloideas son agregados constituidos de fragmentos del amiloide

β ($A\beta$), generados por la actividad secuencial de la β -secretasa y γ -secretasa sobre la Proteína Precursora Amiloide (APP). Los péptidos de $A\beta$ mayoritariamente generados tienen una longitud de 40 ($A\beta_{1-40}$) y 42 ($A\beta_{1-42}$) aminoácidos (Zhang *et al.*, 2011). Se ha estimado que de manera fisiológica ocurre una mayor producción de $A\beta_{1-40}$ (aproximadamente un 90 %) que de $A\beta_{1-42}$ (5-10%) sin

embargo, se conoce que la acumulación del fragmento de $A\beta_{1-42}$ es el determinante en la formación de las placas amiloides (Walsh y Selkoe, 2007). La agregación del $A\beta$ ocurre a través de varios intermediarios; los monómeros de $A\beta$ son solubles, anfipáticos y presentan una estructura en α -hélice en un medio acuoso, mientras que la agrupación en dímeros y oligómeros tienen propiedades termodinámicas más estables debido a que los fragmentos de $A\beta_{1-42}$ forman un núcleo hidrofóbico constituido de láminas β -plegada en condiciones fisiológicas, lo que a su vez le confiere sus propiedades neurotóxicas. Al respecto, se ha reportado que las estructuras oligoméricas extraídas de cerebros humanos *post mortem* son más neurotóxicas que las fibrillas (Walsh y Selkoe, 2007; Shankar *et al.*, 2008; Roychaudhuri *et al.*, 2009).

En las placas amiloides, además de los fragmentos $A\beta_{1-42}$ se han observado fragmentos más cortos que contribuyen a la neurotoxicidad. El fragmento de 11 residuos aminoácidos (GSNKGAIIGLM), amiloide β 25-35 ($A\beta_{25-35}$) tiene la capacidad de formar oligómeros altamente neurotóxicos (Pike *et al.*, 1995; Monji *et al.*, 2002) y también se han aislado de cerebros de pacientes que padecieron EA (Kubo *et al.*, 2002), inclusive se ha mostrado que tienen la propiedad de promover la agregación de las fracciones completas (Liu *et al.* 2004).

La investigación sobre el papel de los fragmentos de $A\beta$ en la fisiopatología de la EA, ha impulsado el uso de modelos animales. Particularmente se ha mostrado que la administración del fragmento $A\beta_{25-35}$ en diferentes regiones del cerebro de ratas, es capaz de producir algunas características neuropatológicas de la EA en etapas iniciales, en las cuales están involucrados mecanismos de EO, de inducción a la apoptosis, daño mitocondrial, neuroinflamación, peroxidación de lípidos, los cuales promueven la pérdida de la plasticidad sináptica e inclusive la muerte de las neuronas colinérgicas lo que a su vez genera daño en el aprendizaje y la memoria espacial (Limón *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012; Limón *et al.*, 2012; Zussy *et al.*, 2013; Patricio-Martínez *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2019).

1.2.2. Evidencia experimental de la asociación del síndrome metabólico y el amiloide β

La prevalencia del SMet y la EA está en constante incremento en todo el mundo debido a dos hechos principales: 1) a los cambios en la alimentación a causa del estilo de vida sedentario y 2) al aumento en la esperanza de vida (Wiss *et al.*, 2018). Además, el SMet y la EA encabezan la lista de los mayores desafíos para el sistema de salud pública (Prince *et al.*, 2013; Swinburn *et al.*, 2011), por lo que es necesario comprender los posibles mecanismos que los vinculan y establecer estrategias preventivas y terapéuticas.

En el abordaje experimental, los reportes muestran que el consumo de una HFD y HSD durante 4 semanas incrementan los niveles de APP, sin embargo, únicamente la HSD incrementa los niveles de la proteína Tau y las fracciones $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, en el hipocampo de las ratas (Selvi *et al.*, 2017) (Figura 6).

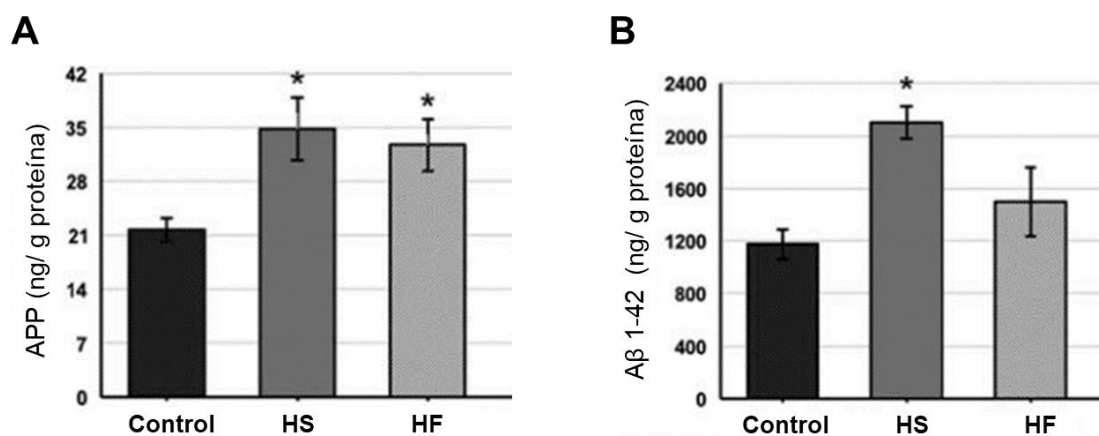


Figura 6. La dieta enriquecida con sacarosa incrementa marcadores de amiloidosis. El consumo de una dieta alta en lípidos (HF, grasa animal con un aporte energético total del 35% en la dieta) y una dieta alta en sacarosa (HS, en la dieta la sacarosa proporcionó el 59.4% de la energía total) durante 4 semanas, incrementó los niveles de la Proteína Precursora Amiloide (APP) en hipocampo (A) y la HS exacerbó los niveles del fragmento $A\beta_{1-42}$ (B) (modificado de Selvi *et al.*, 2017).

Por otro lado, en modelos transgénicos para el estudio de la EA, el consumo de una solución de sacarosa (10%) durante 25 semanas, desencadenó intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hipercolesterolemia, además generó el incremento en los niveles de $A\beta_{1-42}$ en todo el cerebro (Cao *et al.*, 2007), mientras que el consumo de una dieta enriquecidas con grasas y fructosa durante un periodo similar, exacerbó las especies monoméricas y oligoméricas de $A\beta$ en el hipocampo y produjo un daño en el aprendizaje y la memoria (Martino-Adami *et al.*, 2017).

En este aspecto, diversos autores han mostrado que el consumo de HFD (Greenwood y Winocur, 1996; Farr *et al.*, 2008), HSD (Cao *et al.*, 2007; Jurdak *et al.*, 2008) o combinadas (Molteni *et al.* 2002; Kanoski *et al.*, 2010) dañan el aprendizaje y la memoria espacial. Algunos mecanismos involucrados son la pérdida de la plasticidad sináptica, la disminución de factores de crecimiento, los que conducen a la muerte neuronal (Molteni *et al.*, 2002; Kanoski y Davidson, 2010).

1.3. La comunicación colinérgica en la vía septo-hipocampo

1.3.1. Neuroquímica y distribución anatómica

La neurotransmisión colinérgica consiste en un conjunto de proteínas que median la síntesis, almacenamiento, transporte y degradación del neurotransmisor acetilcolina (ACh). La síntesis de ACh ocurre en el citoplasma de las neuronas colinérgicas, a través de la enzima Colina acetiltransferasa (ChAT) a partir de los sustratos acetil-Coenzima A (acetil-CoA) y colina, provenientes de la mitocondria y de la propia degradación de ACh, respectivamente. Una vez sintetizada, ACh es transportada a las vesículas vía transportador vesicular de ACh (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016, figura 7).

La ChAT es una enzima que se localiza principalmente en el citoplasma de las terminales neuronales. Se conocen dos formas principales, una de 69 kDa que se encuentra principalmente en el citoplasma y una de 82 kDa que tiene una localización nuclear (Gill *et al.*, 2003). La actividad de la ChAT es regulada por la despolarización, el flujo de iones Ca^{2+} y por la fosforilación vía Proteína Kinasa Calcio/Calmodulina (CaMK) y por PKC (Bruce y Hersh *et al.*, 1989). Aunque la síntesis de ACh esta mediada por ChAT, su actividad no es un paso limitante en la generación del neurotransmisor, sino que depende de la presencia del sustrato; las concentraciones citoplasmáticas de acetil-CoA y colina son de 50 μ M y 5 μ M respectivamente, sin embargo, los valores de K_m para ChAT son 0.4-1 mM para acetil-CoA y 7-46 μ M para colina (Fisher y Wonnacott, 2012). La organización de gen de ChAT incluye al gen de VAcHT, de ahí que se le denomine locus colinérgico. El marco de lectura para VAcHT se sitúa en el primer intrón del gen de ChAT, además ambos genes integrados comparten algunas secuencias reguladoras del promotor que aseguran la expresión de ambas proteínas, lo que sustenta la importancia de su función en el fenotipo colinérgico (Ferreira-Vieira *et al.* 2016).

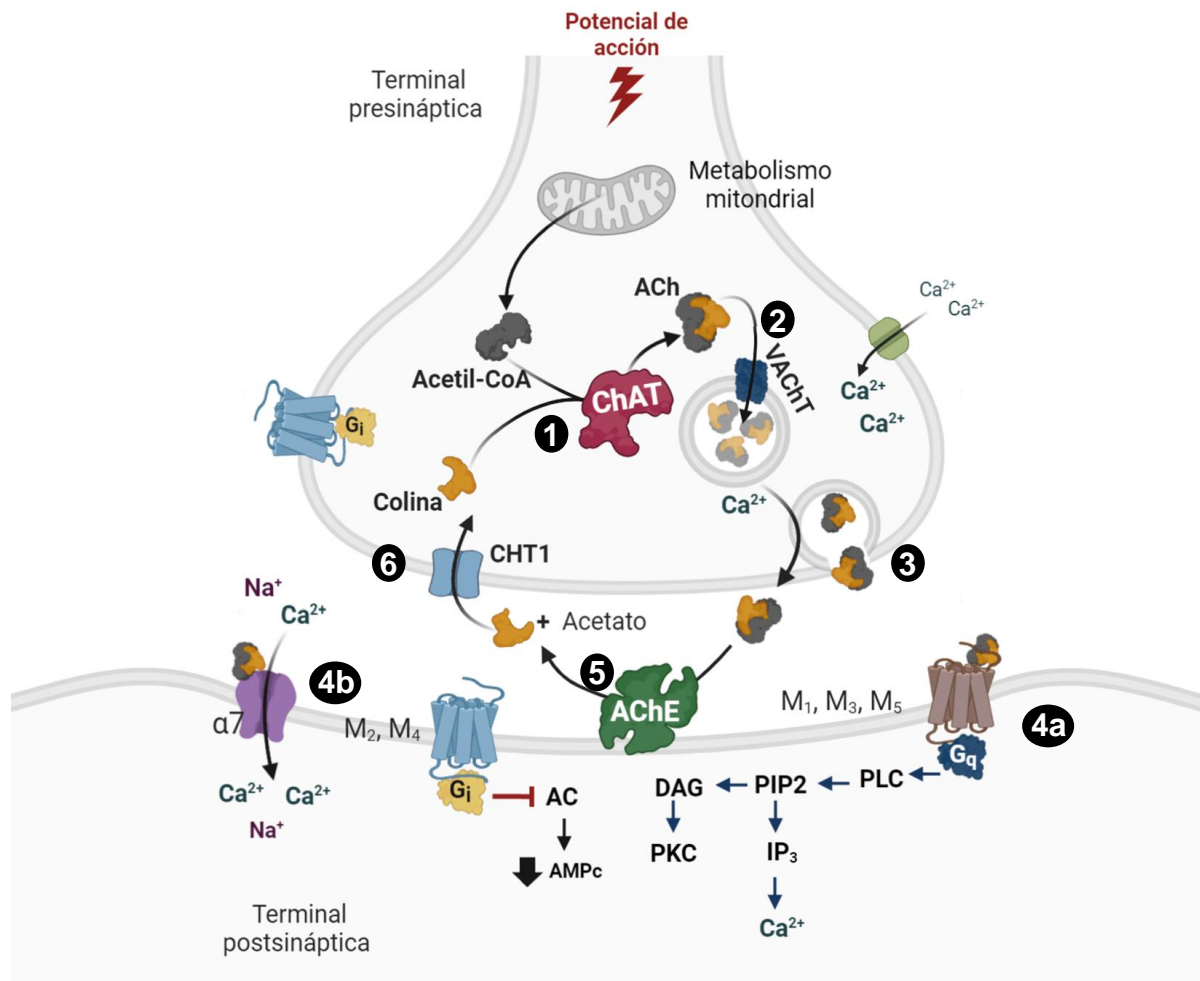


Figura 7. Representación esquemática de la neurotransmisión colinérgica. 1) La ACh se sintetiza en el citosol de la neurona presináptica por actividad de la ChAT a través de los sustratos acetil-Coenzima A y colina. 2) Posteriormente, ACh se almacena inmediatamente en las vesículas vía el transportador VAcHT. 3) Después de un estímulo de despolarización, las vesículas se desanclan del citoesqueleto y se acercan a la terminal presináptica para fusionarse con la membrana neuronal y liberar la ACh a la hendidura sináptica. El neurotransmisor tendrá dos destinos secuenciales, 4a y 4b) activar a receptores nicotínicos o muscarínicos y 5) degradarse por la actividad de AChE, la cual libera acetato y colina, esta última será 6) recapturada a través del CHT1 en la neurona presináptica. *Acetil-Co*: acetil Co-enzima A; *ACh*: acetilcolina; *VAcHT*: transportador vesicular de ACh; *CHT1*: transportador de colina 1; $\alpha 7$: receptor nicotínico $\alpha 7$; M_{1-5} : receptor muscarínico tipos 1 al 5; *PLC*: fosfolipasa C; *PIP2*: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; *DAG*: diacilglicerol, *PKC*: proteína cinasa C; *IP3*: fosfatidilinositol trifosfato; *AC*: adenilato ciclasa; *AMPc*: Adenosin monofosfato cíclico; ↓: disminución (modificado de Ferreira-Vieira et al., 2016).

En secuencia a la neurotransmisión colinérgica, posterior al estímulo de despolarización, ocurre la exocitosis de las vesículas hacia el espacio sináptico (Figura 7) en donde activará a receptores muscarínicos o nicotínicos y posteriormente será degradada por la acetilcolinesterasa (AChE), cuya actividad genera colina y acetato. La AChE es una de las enzimas más eficientes descritas, al mostrar una actividad catalítica de k_{cat}/K_m de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En gen de AChE puede generar una variedad de formas moleculares por splicing alternativo, sin embargo, el dominio catalítico

incluido en los exones 2, 3 y 4 es consistente en todas las formas moleculares; monómero, dímeros o tetrámeros (Fisher y Wonnacott, 2012).

Posterior a la hidrólisis de ACh, la colina liberada en el espacio sináptico es recapturada a través de un sistema de transportadores presentes en la neurona colinérgica presináptica (Figura 7). Se han identificado dos transportadores de colina; de baja afinidad ($K_i \sim 50 \mu\text{M}$) y de alta afinidad (K_i 10-100 nM) y este último es la principal vía de acceso para la colina necesaria en la síntesis de ACh.

Las neuronas colinérgicas están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central, se encuentran principalmente en el cerebro medio, la habénula medial, el cerebro basal anterior, el estriado y en la medula espinal (Ferreira-Vieira *et al.* 2016). Dada su amplia distribución, la comunicación colinérgica está involucrada en múltiples funciones cognitivas y fisiológicas, como la atención, el aprendizaje y la memoria, la respuesta al estrés y los ciclos de sueño y vigilia, en el que el ACh funge principalmente como un neurotransmisor neuromodulador.

La función neuromoduladora de ACh está definida por la anatomía de las proyecciones y la vía septo-hipocampo es la principal ruta de inervación colinérgica hacia el hipocampo. El área septal medial incluye el núcleo septal lateral y medial, y el núcleo de la Banda Diagonal de Broca (DBB) se divide en la región vertical (vDBB) y la región horizontal (hDBB). A través de la fimbria y el fórnix dorsal, el hipocampo se vincula recíprocamente hacia el *septum medial*, formando una sola estructura anatómica continua. A través de estudios de trazamiento retrógrado, lesiones e inmunohistoquímicas, se ha mostrado que las proyecciones están organizadas de manera topográfica a través de los ejes mediolateral y rostrocaudal (Teles-Grilo y Mellor, 2013). En la formación hipocampal, la región CA1 las neuronas piramidales y en el giro dentado (DG) las neuronas de la capa granular reciben fibras de las neuronas localizadas a lo largo de la vDBB mientras que las neuronas localizadas en la región lateral de la DBB proyectan a la parte medial de la fimbria hacia todas las regiones CA1 y CA3 (Figura 8).

Las proyecciones neuronales de la vía septo-hipocampal no solo son colinérgicas, también incluye neuronas GABAérgicas y Glutamatérgicas. Es decir, las proyecciones del *septum medial* a todas las regiones del hipocampo alcanzan el *estratum oriens* de las regiones CA1y CA3, en donde se establecen los contactos sinápticos con las dendritas de las células piramidales y con los somas de las interneuronas GABAérgicas y sus dendritas. En conjunto, las neuronas Glutamatérgicas del *septum medial* inervan específicamente hacia las neuronas piramidales de la región CA3 (Figura 8).

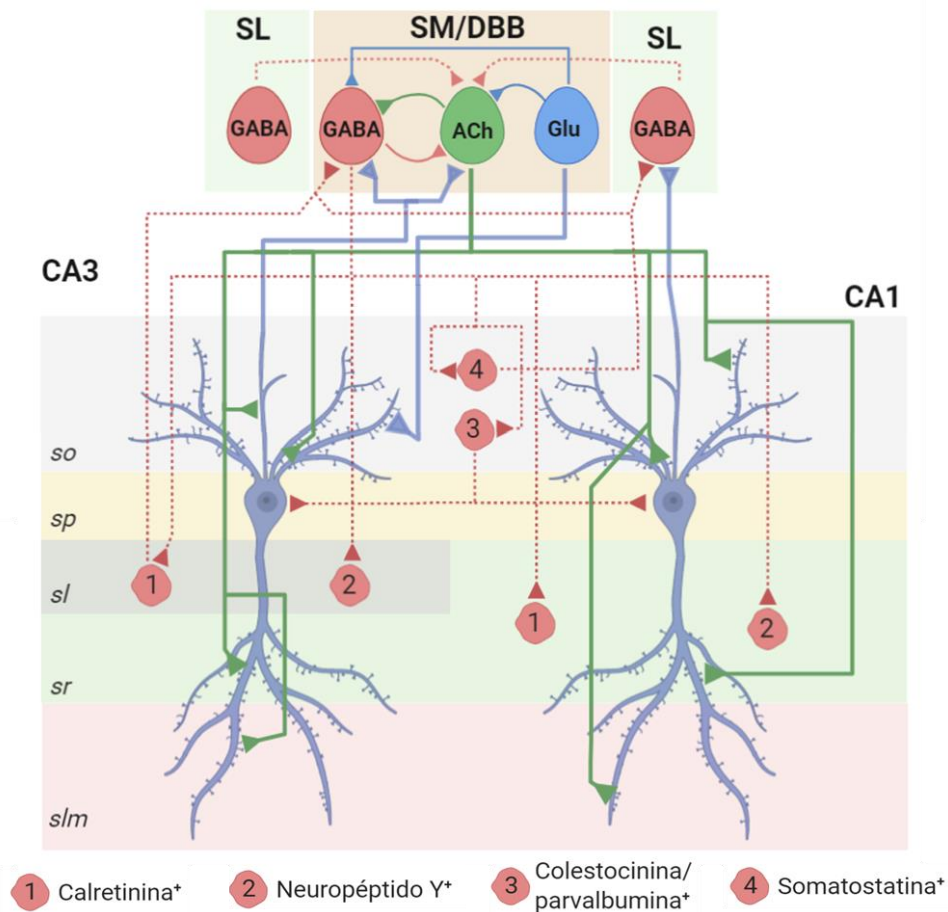


Figura 8. Representación esquemática de las conexiones recíprocas entre el *septum medial* y el *hipocampo*. La naturaleza de las conexiones incluye neuronas Glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas, distribuidas en las capas celulares de la formación hipocámpal y en las áreas del septum. *ACh*: neuronas colinérgicas; *Glu*: neuronas glutamatérgicas; *so*: stratum oriens; *sp*: stratum pyramidale; *sl*: stratum lucidum; *sr*: stratum radiatum; *slm*: stratum lacunosum moleculare (modificado de Teles-Grilo y Melo, 2013).

La neurotransmisión colinérgica tiene un papel importante en los procesos cognitivos, se ha postulado que la pérdida de las neuronas colinérgicas y con ello la disminución de la inervación hacia el hipocampo y la corteza, son las causas que propician el deterioro cognitivo que sucede en la EA (Bartus, 2000).

1.3.2. Participación de la comunicación colinérgica en la navegación

La navegación se puede definir como el proceso que determina y mantiene el curso o trayectoria de un lugar a otro y es un proceso que requiere un comportamiento que incluye el procesamiento de una variedad de estímulos sensoriales y propioceptivos, el almacenamiento y la recuperación de la información. La ejecución de la navegación en roedores comprende una compleja red de regiones cerebrales que incluye al hipocampo, la corteza entorrinal, el giro parahipocampal, regiones de la corteza parietal y la corteza prefrontal, el cerebelo, los ganglios basales, el área septal y el núcleo Magnocelular (Solari y Hangya, 2018) (Figura 9).

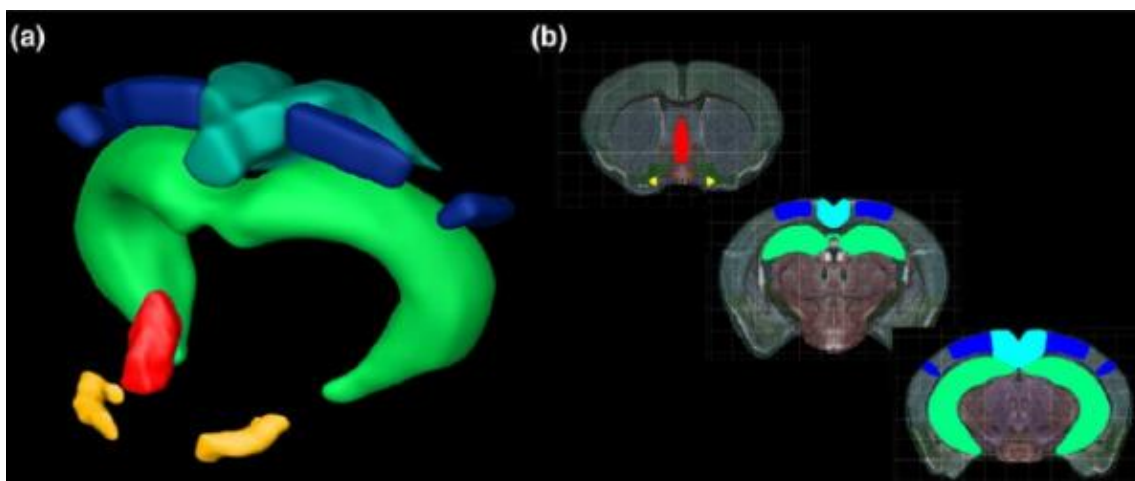


Figura 9. Esquemas de las regiones involucradas en la navegación en roedores. En a) la representación en 3 dimensiones y en b) representaciones coronales del *septum medial* (rojo), el núcleo Magnocelular (amarillo), el hipocampo (verde), las cortezas parietales (azul) y la corteza retrosplenial (cian) (tomado de Solari y Hangya, 2018).

El lóbulo temporal medial, que incluye a la región hipocampal (hipocampo propiamente, al giro dentado y a las cortezas adyacentes (perririnal, entorrinal y parahipocampal) son estructuras clave en el dominio cognitivo espacial que incluye la navegación y la memoria espacial (Lavenex y Amaral, 2000; Fernández-Ruiz y Oliva, 2016). Particularmente, la integridad de la comunicación que recibe el hipocampo es importante para la representación de los elementos ambientales en un tiempo y espacio, así como permitir la formación de un mapa cognitivo que sea útil en la navegación y en la interpretación del ambiente (Schiller *et al.*, 2015).

Dado el papel crucial del hipocampo en la navegación y la memoria espacial, es esencial la integridad de la comunicación y la modulación que recibe por la inervación colinérgica proveniente del *septum medial*. Durante la navegación, la neurotransmisión colinérgica permite el mantenimiento de las oscilaciones Theta, permitiendo que las células piramidales permanezcan “activas” para

mediar funciones como la exploración, el movimiento, la velocidad e inclusive la consolidación de la memoria (Solari y Hangya, 2018) además, algunas de estas funciones son mediadas directamente por la activación de los receptores colinérgicos. Por un lado, la activación de los receptores ionotrópicos nicotínicos, principalmente $\alpha 7$, permiten la despolarización de las interneuronas GABAérgicas mientras que la activación de los receptores muscarínicos M1 localizados en las neuronas piramidales se relaciona con la plasticidad sináptica y la propia generación de las oscilaciones Theta (Gu y Yakel, 2011).

El papel del *septum medial* en el aprendizaje espacial y la navegación se ha estudiado mediante lesiones específicas (ácido iboténico o agonistas AMPA) o ablación de las neuronas colinérgicas en roedores, y posteriormente evaluar el daño mediante pruebas cognitivas. Reportes experimentales indican que la administración del antagonista M1 pirenzepina, bloquea el aprendizaje espacial (Hagan *et al.*, 1987) mientras que una lesión con ácido iboténico en el *septum medial* produce un deterioro en la navegación espacial, el cual está correlacionado con la disminución de ChAT en hipocampo, lo que demuestra que la innervación colinérgica hacia el hipocampo es crucial en el desempeño de tareas espaciales (Hagan *et al.*, 1988).

1.3.3. Vulnerabilidad colinérgica por dietas hipercalóricas

Considerando que el hipocampo muestra susceptibilidad al daño por el consumo de HSD y HFD (Kanoski y Davidosn, 2011), y que a su vez mantienen una comunicación recíproca con las regiones del *septum medial* y la DBB, ha sido de interés evaluar el efecto de las dietas hipercalóricas sobre la función colinérgica.

Ullrich y colaboradores (2010) demostraron que la ingesta de una dieta con elevado contenido en colesterol durante 5 meses produce una disminución en el número de células positivas a ChAT en el núcleo basal de Meynert, en los niveles de ACh en la corteza e incrementa moderadamente el procesamiento de la APP, lo que se correlacionó con un daño en la memoria espacial (Figura 10).

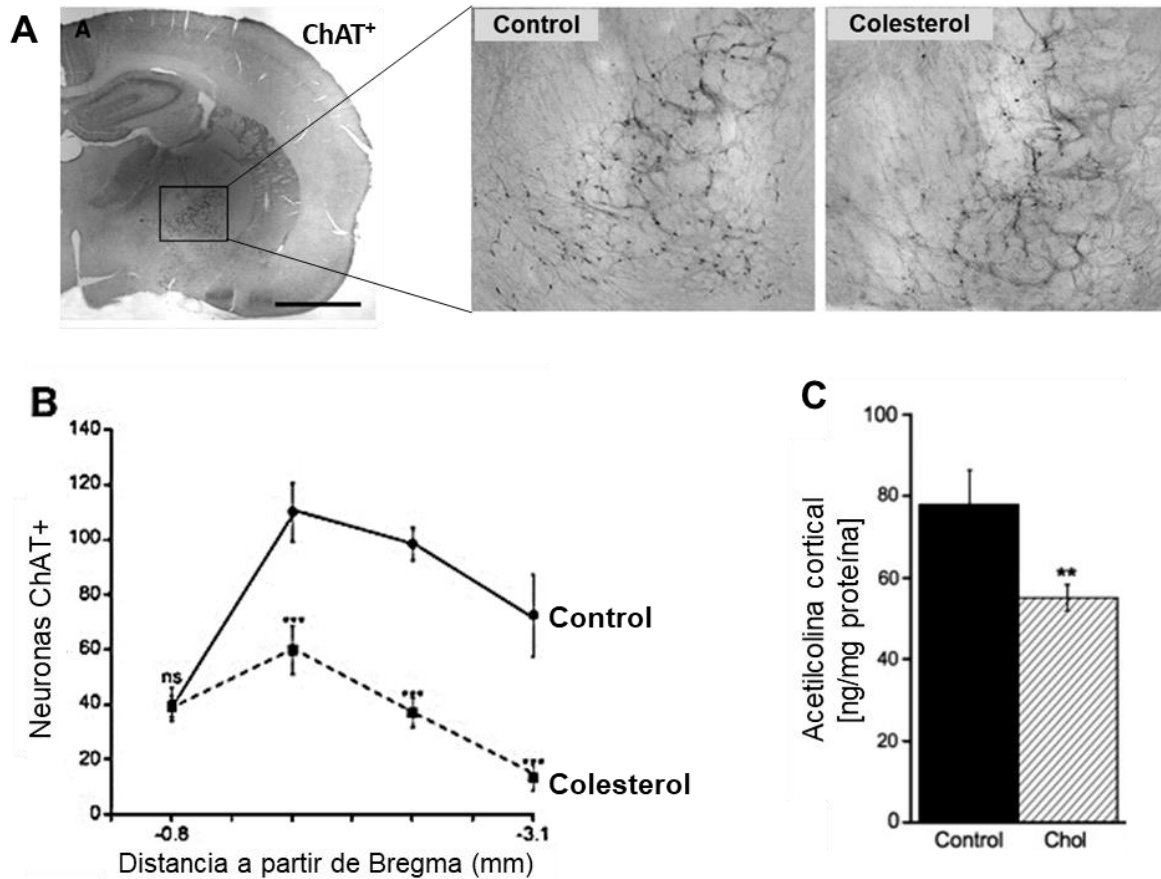


Figura 10. La dieta enriquecida con colesterol daña la actividad colinérgica en rata. En **A**) se evidencian las células positivas a ChAT en el núcleo basal de Meynert en un corte coronal del cerebro de rata y muestran las fotografías representativas del grupo control y el tratamiento con la dieta alta en Colesterol. **B**) El consumo de una dieta alta en colesterol durante 5 meses disminuyó el número de neuronas ChAT+ en el núcleo basal de Meynert y **C**) los niveles de acetilcolina en la corteza de ratas (modificado de Ullrich *et al.*, 2010).

Lo que demostró que una condición de hipercolesterolemia asemeja algunas características neuropatológicas de la EA. Sin embargo, no se evaluaron otras regiones colinérgicas como lo es el *septum medial*. Respecto al efecto de las dietas sobre otros marcadores de función colinérgica, Kaizer y colaboradores (2004), mostraron el consumo de sacarosa al 20% o una HFD (25% de grasas) durante 6 meses disminuye la actividad de AChE en el hipocampo y en la corteza cerebral (Figura 11). Este efecto se atribuyó al desarrollo de alteraciones metabólicas que asemeja al SMet en humanos.

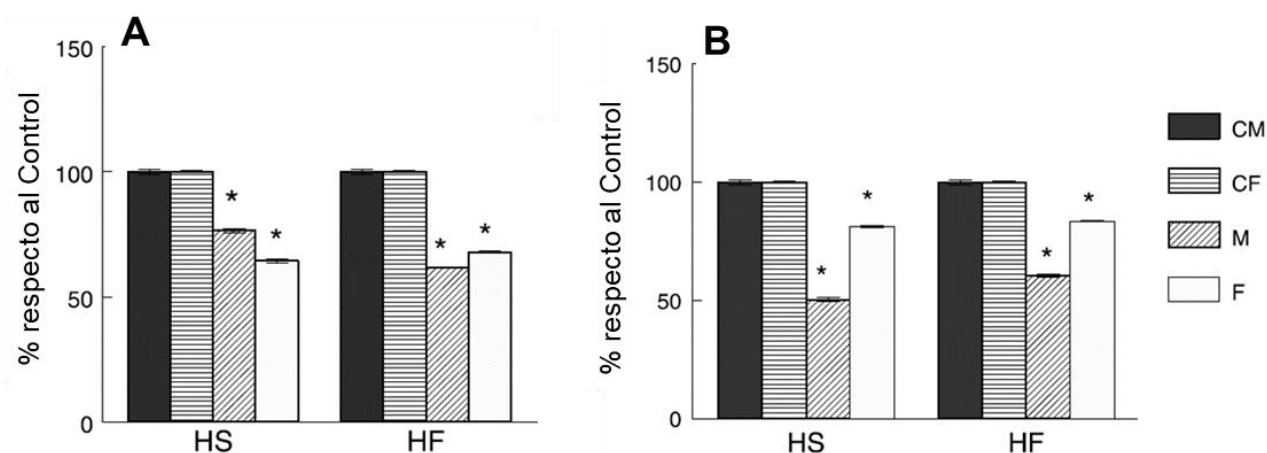


Figura 11. El consumo de sacarosa al largo plazo produce cambios en la actividad de acetilcolinesterasa. Ratitas macho y hembra consumieron una dieta alta en sacarosa (20%) o dieta alta en grasas (25%) durante 6 meses. Ambas dietas disminuyeron la actividad de AChE en A) el hipocampo y en B) la corteza. CM: machos control, CF; hembras control, M; machos, F; hembras, HS; Alta en sacarosa, HF; Alta en grasas (modificado de Kaizer et al., 2004).

En la búsqueda de los mecanismos de daño que vinculan las alteraciones metabólicas (colesterolemia, intolerancia a la glucosa, obesidad, hiperglicemia e hipertriglicéridemia) con la disfunción colinérgica, se ha propuesto que la resistencia a la insulina puede ser un mecanismo que describe su relación. Sposato y colaboradores (2018), desarrollaron un modelo de resistencia a la insulina en cultivos de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, en su estudio observaron que el tratamiento con el factor de crecimiento nervioso (NGF) reduce la resistencia a la insulina *in vitro* e *in vivo*, al activar a IRS1 y rescatar la expresión de c-Fos mediante la activación de TrkA, sugiriendo que la resistencia a la insulina en el *septum medial* se desarrolla antes de ser detectable en la corteza y el hipocampo, similar a lo que se observa en la EA.

Lo anterior señala la susceptibilidad colinérgica y los efectos ocasionados por un desequilibrio metabólico que produce el consumo de dietas hipercalóricas, sin embargo, no existen datos que relacionen contundentemente al SMet como factor de riesgo que exacerbe el daño colinérgico que en principio muestra el modelo del péptido A β_{25-35} sobre la vía septo-hipocampo implicada en el aprendizaje y memoria espacial.

2. Justificación

El SMet es un factor de riesgo para diversas enfermedades degenerativas, con una elevada prevalencia en individuos mayores a 20 años (>25%) y 60 años (50%) (Chew *et al.*, 2006). Un elemento importante para el desarrollo de SMet es el consumo cotidiano de bebidas endulzadas. El impacto económico, social y de salud que representa el SMet, lo centran como un aspecto necesario de estudio. Su estudio experimental ha proporcionado información sobre los principales mecanismos que explican su fisiopatología; el desarrollo de obesidad, de la resistencia a la insulina, la inflamación y EO de origen metabólico (Furukawa *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2016 Olesfsky y Glass, 2010).

En la actualidad, múltiples reportes sustentan el hecho de que el SMet es un factor que predispone y acelera el curso de la fisiopatología de la EA (Whitmer *et al.*, 2005; Vanhaen *et al.*, 2006; Yaffe, 2007; Razay *et al.*, 2007). La implementación de HSD y HFD, como estrategias de inducción de obesidad o SMet, han evidenciado que la acumulación de tejido adiposo, hipercolesterolemia, resistencia a la insulina o hipertensión en los roedores, son factores que contribuyen al daño en el aprendizaje y la memoria, cuyos mecanismos de daño incluyen la acumulación de A β , la pérdida de la función colinérgica, la disminución de plasticidad sináptica y la resistencia a la insulina en el hipocampo y *septum medial* (Molteni *et al.*, 2002, Cao *et al.*, 2007, Jurdak *et al.*, 2008; Ullrich *et al.*, 2010; Kosari *et al.*, 2012; Kaizer *et al.*, 2004; Selvi *et al.*, 2017; Sposato *et al.*, 2018), procesos neurotóxicos similares a los observados en modelos experimentales empleados para el estudio de la EA, como lo es la administración del A β ₂₅₋₃₅ en corteza temporal, el hipocampo o el *septum medial* (Limón *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012; Patricio-Martínez *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior, proponemos evaluar el papel del SMet, inducido por consumo de sacarosa, como un potenciador de la neurotoxicidad del fragmento A β ₂₅₋₃₅ mediante la evaluación de una prueba de aprendizaje y memoria espacial cuya base anatómica es la vía septo-hipocampal y en la que determinarán los marcadores colinérgica; ChAT, AChE, NGF, como un primer acercamiento en la evaluación de su funcionalidad. Nuestros hallazgos para proporcionar evidencia sobre la implicación del SMet más el A β ₂₅₋₃₅ en la función colinérgica de la vía septo-hipocampo y su efecto sobre el aprendizaje y la memoria espacial.

3. Hipótesis

El síndrome metabólico y la administración intrahipocampal del péptido amiloide β_{25-35} dañan la memoria espacial, disminuyen la expresión de enzimas colinérgicas y del factor de crecimiento nervioso en ratas.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del síndrome metabólico y la administración intrahipocampal del péptido amiloide β_{25-35} sobre la memoria espacial, la expresión de enzimas colinérgicas y del factor de crecimiento nervioso en ratas.

4.2. Objetivos particulares

- 1) Evaluar el efecto del síndrome metabólico y la administración intrahipocampal del péptido amiloide β_{25-35} sobre el aprendizaje y la memoria espacial.
- 2) Evaluar el efecto del síndrome metabólico y la administración intrahipocampal del péptido amiloide β_{25-35} sobre la expresión de colina acetiltransferasa y acetilcolinesterasa en el *septum medial* y en el hipocampo de ratas.
- 3) Evaluar el efecto del síndrome metabólico y la administración intrahipocampal del péptido amiloide β_{25-35} sobre la expresión del factor de crecimiento nervioso en el *septum medial* y el hipocampo de ratas.

5. Metodología

5.1. Diagrama experimental

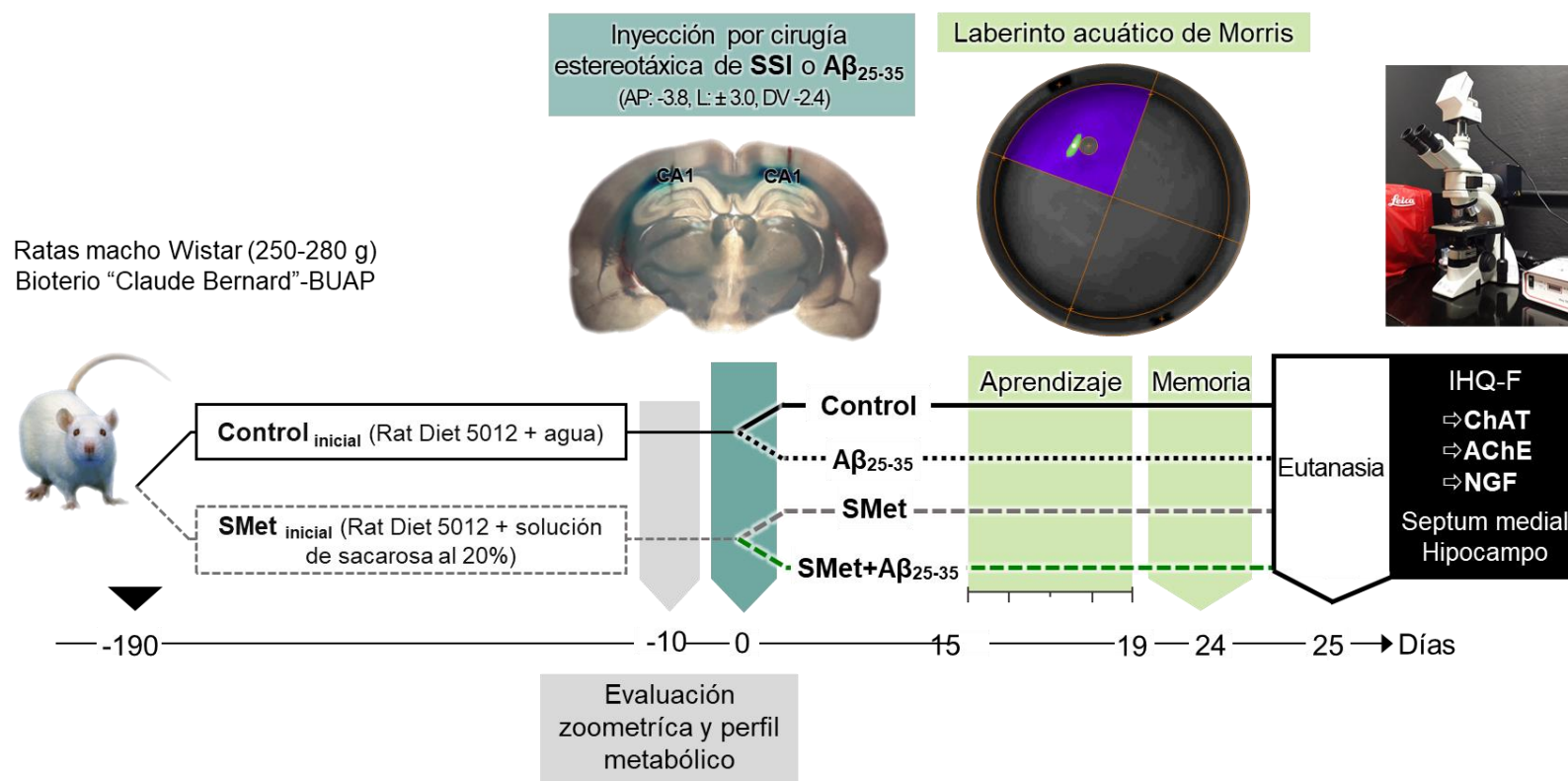


Figura 12. Panorama general del protocolo experimental. Se formaron dos grupos iniciales; el grupo SMet_{inicial} consumió una solución de sacarosa al 20% y el grupo Control_{inicial} recibió agua purificada, ambos grupos durante 180 días. Posterior a la caracterización del SMet, se administró SSI o $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo mediante cirugía estereotáxica y se generaron los grupos: Control (Control+SSI), SMet (SMet+SSI), $A\beta_{25-35}$ (Control+ $A\beta_{25-35}$), SMet+ $A\beta_{25-35}$ (SMet+ $A\beta_{25-35}$). Al finalizar la prueba de aprendizaje y la de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, se evaluó la expresión de colina acetiltransferasa, acetilcolinesterasa y de factor de crecimiento nervioso en el hipocampo y el *septum medial*.

5.2. Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar ($N= 67$) de un peso aproximado de 250 - 280 g al inicio del experimento, provenientes del bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Se alojaron dos ratas por caja de policarbonato (40 cm x 27 cm x 21cm) en condiciones controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) y ciclos luz/oscuridad de 12 horas (7:00 -19:00 horas) en el vivario del laboratorio de Neurofarmacología. Los animales mantuvieron libre acceso de alimento y agua o solución de sacarosa al 20% (según el grupo experimental). Los procedimientos de mantenimiento y cuidado de los animales de experimentación se realizaron en seguimiento a la Norma Oficial Mexicana *Especificaciones técnicas para la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio NOM 062-ZOO-1999*, conjuntamente a la aprobación de los protocolos de manipulación por el *Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)* de la BUAP.

5.3. Estrategia de inducción al modelo experimental de síndrome metabólico

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos iniciales: el grupo Control ^{inicial} ($n=30$) recibió agua purificada y el grupo inducido a SMet ^{inicial} ($n=37$) consumió una solución de sacarosa al 20% (p/v, Velasco *et al.*, 2012), ambos grupos experimentales consumieron alimento estándar (*Rat Diet 5012, PMI Nutrition International, LLC, Brentwood, MO*) con un 22% de proteína, un 4% de grasa y un 5% de fibra por cada 100 g de alimento. De acuerdo con el proveedor, *Rat Diet 5012* proporciona 3.07 kcal/g de energía metabolizable (energía que proporciona el alimento para los procesos metabólicos del animal, ver hoja de información nutricional en anexo).

La dieta establecida en los grupos Control y SMet iniciales permaneció *ad libitum* durante todo el protocolo experimental (Figura 12), a excepción de los periodos de ayuno.

5.3.1. Preparación y administración de la solución de sacarosa al 20%

Se disolvieron 200 g de sacarosa (azúcar refinada) por cada litro de agua purificada. La solución se preparó y reemplazó diariamente en una botella por caja-habitación.

5.3.2. Seguimiento del consumo calórico

El consumo energético (kcal) consistió en la suma de las calorías aportadas por el alimento y la solución de sacarosa, de acuerdo con el tratamiento establecido en la agrupación inicial. Las calorías aportadas se calcularon a partir del registro de la cantidad de alimento, agua purificada o solución de sacarosa al 20% consumidas aproximadamente cada 24 h y los valores obtenidos fueron

sustituídos en una de las siguientes fórmulas matemáticas presentadas en la Figura 13, es decir se multiplicó la cantidad de alimento consumido por la energía metabolizable (3.07 kcal/g, ver anexos) y para el grupo inducido a SMet se sumaron las kcal que aportó la sacarosa.

Dieta Control:

$$\text{Consumo energético} = \text{Alimento consumido (g)} \times \text{Energía metabolizable (kcal/g)}$$

Dieta SMet:

$$\text{Consumo energético} = \left(\text{Alimento consumido (g)} \times \text{Energía metabolizable (kcal/g)} \right) + \text{Aporte calórico de la sacarosa (kcal/g)}$$

Figura 13. Fórmulas para calcular el consumo energético. La energía metabolizable es la energía disponible en el alimento para los procesos metabólicos del animal, sin considerar la energía pérdida en heces, orina y gases y el valor se indicó en la ficha nutricional del *Rat Diet 5012* proporcionada por el proveedor. Por cada gramo de sacarosa se aportan 4 kcal.

5.4. Determinación de los parámetros zoométricos

El peso corporal (g) se registró diariamente para el seguimiento de los tratamientos. La evaluación zoométrica al inicio del tratamiento (día 0) y al término del periodo de inducción a SMet (día 180) incluyó: el peso corporal, la longitud corporal (manteniendo en plano vertical a la rata, de la punta de la nariz a la base de la cola, cm), la circunferencia abdominal (en posición decúbito prono, se consideró el perímetro inmediatamente después de las extremidades posteriores, cm) y el IMC (kg/m^2) (Figura 14).

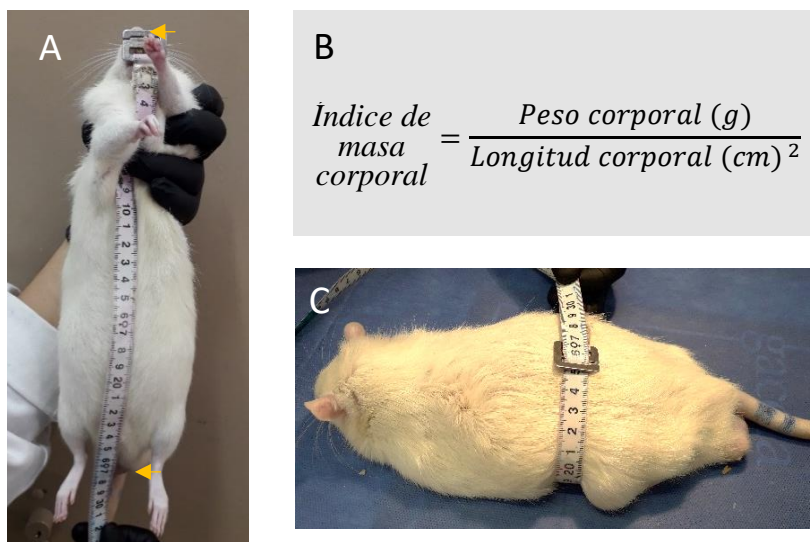


Figura 14. Determinaciones zoométricas en rata Wistar. En **A** la posición en la que se determinó la longitud corporal de la punta de la nariz a la base de la cola (→). En **B** la fórmula que emplea el peso y la longitud corporal para calcular el IMC (kg/m^2) y en **C** la posición en que se determinó la circunferencia abdominal.

5.5. Evaluación del perfil metabólico

5.5.1. Evaluación de la curva de tolerancia a la glucosa

En el día 180 de tratamiento, todos los animales se colocaron en ayuno por 12 horas; se retiró el alimento y se mantuvo el agua purificada en el grupo Control mientras que en el grupo SMet, la solución de sacarosa se reemplazó por agua purificada. En la prueba de tolerancia a la glucosa se administraron 2 g de glucosa/kg de peso por vía intraperitoneal (i.p.) posteriormente, se realizó un corte en la porción distal de la cola con previa asepsia, y se obtuvo una gota de sangre para la determinación de la concentración de glucosa a los 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la administración, mediante un método enzimático- electroquímico (*Accu Check Performance*®).

5.5.2. Obtención de sangre y determinaciones en suero

La toma de muestra sanguínea se realizó 4 días después de la curva de tolerancia a la glucosa. Los animales fueron sometidos nuevamente a ayuno y bajo anestesia con ketamina y xilacina (75:10 mg/kg, i.p.), se obtuvo 1.5 -2.0 mL de sangre mediante la punción del seno venoso retroorbital. Se permitió la coagulación de la sangre y se centrifugó a 7000 rpm durante 25 min a 4°C, el suero obtenido se separó en alícuotas para su procesamiento o almacenamiento.

Una de las alícuotas del suero se utilizó para determinar inmediatamente la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol de alta densidad (Col-HDL) mediante los métodos enzimáticos; glucosa oxidasa/peroxidasa, glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa, colesterol oxidasa/peroxidasa y fosfotungstato/Mg-colesterol oxidasa/peroxidasa, respectivamente. El suero se procesó de acuerdo con la ficha técnica del proveedor y la detección espectrofotométrica se realizó a 500 nm en el espectrofotómetro *VARIAN UV-Vis* (*BioTek*).

Otra alícuota de suero se resguardó a -80°C para la determinación de insulina mediante ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) en sándwich con el kit *Rat/Mouse Insulin Millipore® (EZRMI-13K)*. El arreglo de la placa de ELISA incluyó; la curva de calibración con los estándares (0.2, 0.5, 1.0, 2.0 5.0 y 10 ng/mL), el control de calidad 1 (0.95 ng/mL), el control de calidad 2 (3.14 ng/mL) y los sueros problema, todas las determinaciones se colocaron por duplicado. La detección de la absorbancia se realizó a 450 nm y 590 nm en el lector de microplacas *Synergy 4 (BioTek)* y la concentración de insulina se calculó a partir de la ecuación de la recta generada en la curva de calibración (Figura 15).

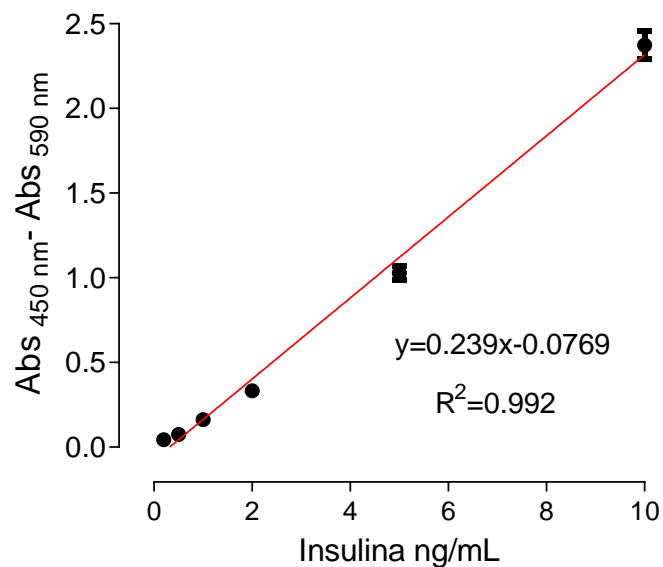


Figura 15. Curva de calibración para la determinación de insulina en suero en rata. La curva de calibración de insulina incluyó los estándares de 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 5.0 y 10 ng/mL por duplicado. La Absorbancia (Abs) graficada es la diferencia de las lecturas obtenidas a 450 nm y 590 nm. A partir de la ecuación de la recta se calculó la concentración de insulina en los sueros problema.

5.6. Cirugía estereotáxica

5.6.1. Localización del sitio de administración

Previo a la cirugía estereotáxica en los grupos experimentales, se corroboraron las coordenadas experimentales para la región CA1 del hipocampo. El protocolo consistió en la administración por cirugía estereotáxica de 1 μ L de solución de azul de metileno 200 ppm empleando las coordenadas: anteroposterior (AP): -3.8 mm, lateralidad (L): \pm 3.0 mm y dorsoventral (DV): -2.4 mm respecto a Bregma de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998). A continuación, se extrajo el cerebro y se sumergió en solución fijadora durante 24 horas para realizar cortes coronales secuenciales de 200 μ m de grosor, en los cuales se verificó la presencia de la cánula y la difusión del colorante en la región de interés, a través de un estereoscopio (VELAB VE-S4, Figura 16).

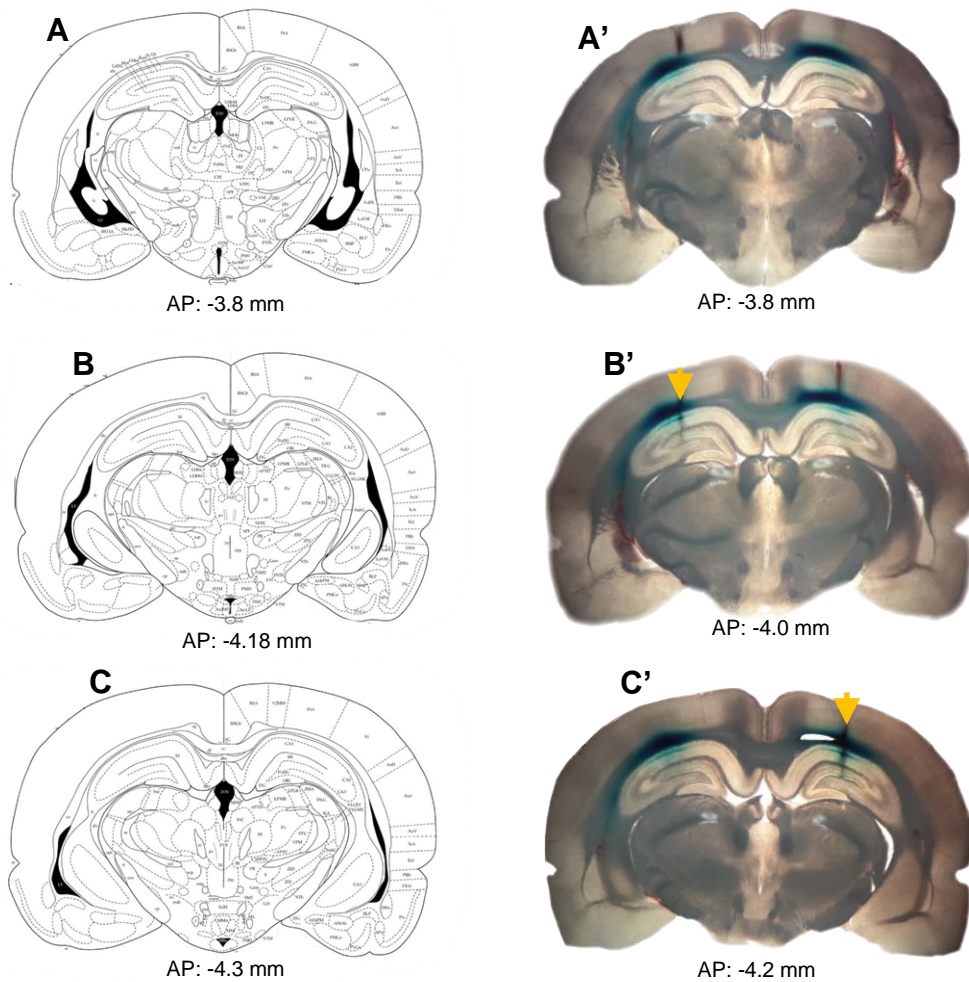


Figura 16. Localización del sitio de lesión. En A, B y C se muestran los diagramas correspondientes a la secuencia de cortes coronales de 200 μ m de grosor en A', B' y C' provenientes de una rata sometida a cirugía estereotáxica en la que se administró bilateralmente 1 μ L de azul de metileno en la región CA1 del hipocampo. Las puntas de flecha amarillas señalan la trayectoria de la cánula.

5.6.2. Preparación de los oligómeros de amiloide β_{25-35}

El péptido $A\beta_{25-35}$ (*Sigma*, EUA) se preparó a una concentración de 100 μM en solución salina isotónica (SSI) a partir de una solución stock de 1mM. La solución de $A\beta_{25-35}$ 100 μM se incubó durante 36 horas a temperatura constante de 37°C para su agregación (Limón *et al.*, 2009).

5.6.3. Administración en la región CA1 del hipocampo

Posterior a la evaluación de los parámetros zoométricos y las determinaciones en suero, únicamente las ratas caracterizadas como SMet (comparados con el grupo Control en el día 180 de tratamiento) fueron incluidas para continuar con los protocolos de cirugía estereotáxica, las pruebas conductuales y el análisis histológico.

Los grupos Control _{inicial} y SMet _{inicial} se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos para la administración de SSI o los oligómeros del $A\beta_{25-35}$ (Figura 12). La cirugía estereotáxica se realizó bajo anestesia con ketamina: xilacina (75:10 mg/kg, i.p.), las ratas se colocaron en el equipo estereotáxico (Stolting Co.) para la administración bilateral de 1 μL de SSI o de los oligómeros de $A\beta_{25-35}$ 100 μM en la región CA1 del hipocampo. Las coordenadas utilizadas, fueron AP: -3.8 mm, L: \pm 3.0 mm, DV: -2.4 mm respecto a Bregma y la administración se realizó con una bomba de infusión a una velocidad de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La nomenclatura asignada a los grupos experimentales posterior a la cirugía fue; el grupo *Control* y el grupo $A\beta_{25-35}$; que pertenecieron al grupo Control _{inicial} y se les administró SSI o los agregados del $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo respectivamente, y los grupos *SMet* y *SMet*+ $A\beta_{25-35}$; que pertenecieron al grupo SMet _{inicial} y se les inyectó SSI o los oligómeros de $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo, respectivamente. Posterior a la recuperación de la anestesia, las ratas regresaron a sus cajas y recibieron los cuidados postoperatorios como administración de antibiótico y monitoreo de la cicatrización de la herida.

5.7. Protocolo de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris (LAM) de *Stolting*® consiste en una tina circular de acero inoxidable (170 cm de diámetro y 60 cm de altura), con una plataforma de escape de acrílico transparente (30 cm de alto y 12 cm de diámetro) que se oculta 2 cm por debajo del nivel del agua. Se colocaron referencias espaciales en la pared interior de la tina; señales *intralaberínticas* y alrededor de la habitación de conducta; *señales extralaberínticas*, las cuales permanecieron constantes durante toda la evaluación (Figura 17 A).

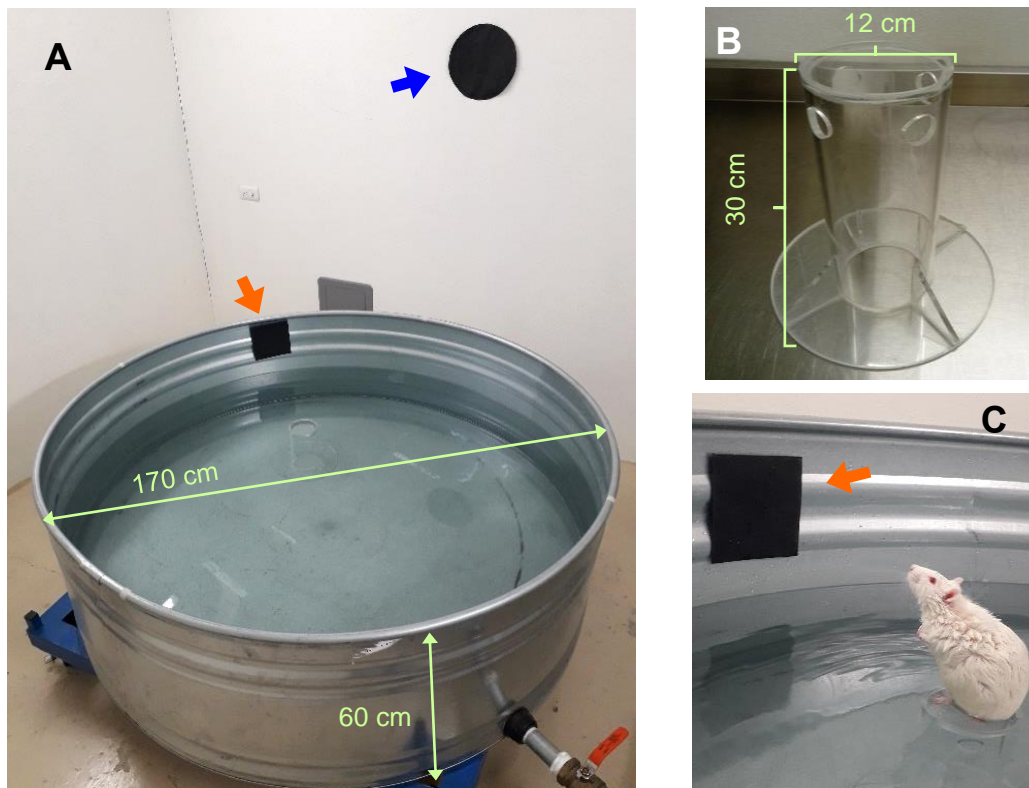


Figura 17. Componentes del laberinto acuático de Morris. En A se muestra la localización de tina en la habitación conductual y respecto a ella la disposición de las señales intralaberínticas (→) y extralaberínticas (→). En B la plataforma de escape de acrílico transparente. En C se muestra a una rata sobre la plataforma de escape asociando una señal intra laberíntica.

Para el protocolo conductual el área de la tina se dividió considerando los puntos cardinales, por lo que se designaron 4 puntos de partida; Norte (N), Sur (S), Este (E) y Oeste (O) (Figura 18 A) y se generaron los cuadrantes correspondientes; el cuadrante SE (cuadrante blanco, donde se localiza la plataforma), el cuadrante SO (a la derecha de SE), el cuadrante NE (a la izquierda de SE) y el NO (opuesto a SE) (Figura 18 B). En la evaluación el agua se mantuvo entre 22°C –24°C.

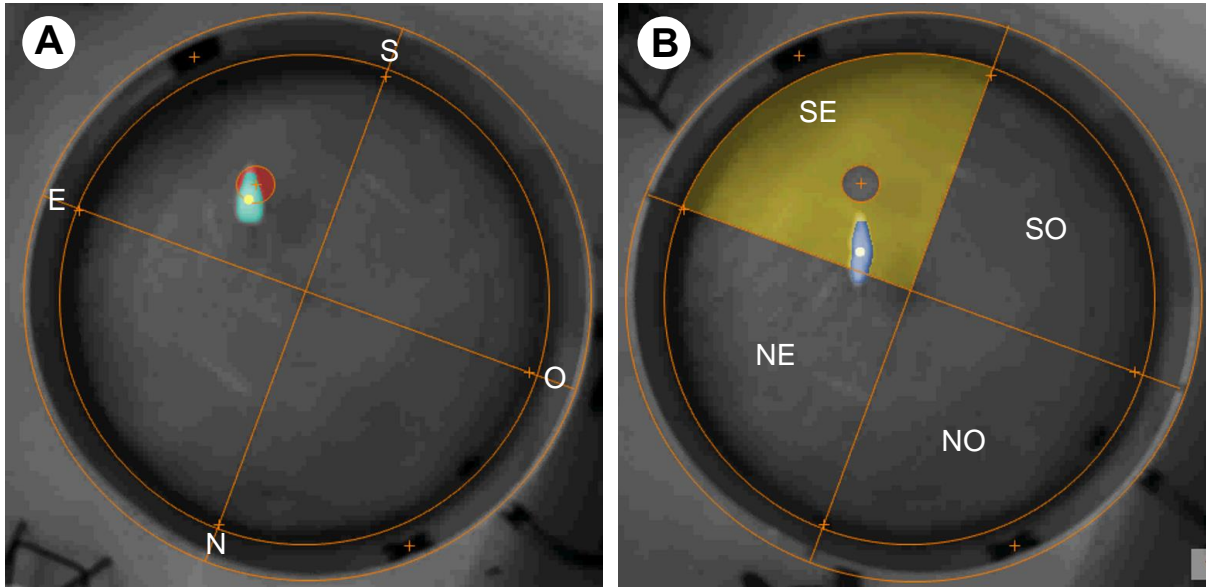


Figura 18. Diseño y elementos del mapa para el laberinto acuático de Morris. Se delimitó la región de la pared de la tina (circulo externo) y la zona de navegación (circulo interno). En **A** se indican los puntos de partida (N, S, E y O), la detección de la rata en la región iluminada en verde (sombra del animal) y el centro de gravedad (punto amarillo) a partir del cual se trazaron las trayectorias de navegación. A modo de ejemplo se muestra la visita a la zona de la plataforma (rojo). En **B** las líneas en naranja delimitan los cuadrantes y se ejemplifica la visita al cuadrante blanco (SE) por la rata (sombra iluminada en azul).

El aprendizaje se evaluó del día 15 al 19 posterior a la cirugía (Figura 12). Los animales realizaron 20 ensayos, distribuidos en 4 ensayos por día. Un ensayo consiste en el ingreso de la rata desde cada punto de partida (Figura 18 A) hasta localizar la plataforma de escape o bien al invertir un tiempo máximo de 90 segundos. Únicamente, en el primer ensayo del primer día de aprendizaje, si el animal no logró localizar la plataforma, se le tomó amablemente del dorso y se le dirigió dentro del agua hasta la plataforma. A todas las ratas se les permitió permanecer 30 segundos en la plataforma, únicamente durante el primer ensayo. Los ensayos se ejecutaron en el siguiente orden; 1) N, 2) O, 3) S y 4) E. Al finalizar el ensayo los animales regresaron a la caja de resguardo y el siguiente ensayo comenzó 50 minutos después.

La memoria espacial se evaluó el día 24 posterior a la cirugía (Figura 12). En esta prueba la plataforma de escape se excluyó de laberinto y los animales ingresaron a la tina desde el punto N para ejecutar un solo ensayo de 90 segundos.

La secuencia conductual se programó en *ANY-maze 5.3* y se videograbó con la cámara monocromática (*DMK 22AUC03*) acoplada simultáneamente al software. La recolección de los parámetros; latencia al escape (s), distancia recorrida (m), velocidad promedio (m/s), latencia al primer cruce (s) y el número de cruces a la zona de la plataforma de escape, el número de visitas y

el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco (s), las trayectoria de navegación y los mapas de calor en la fase de aprendizaje y de memoria de cada grupo experimental se registraron con *ANY-maze* 5.3.

5.7.1. Análisis de las trayectorias de navegación y los mapas de calor

Las trayectorias de navegación se trazaron en tiempo real tomando como referencia el centro de gravedad de la rata (punto central sobre la sombra de la rata, Figura 18 A). El inicio de la trayectoria se indicó con un punto azul y el término con un punto rojo (Figura 19 A).

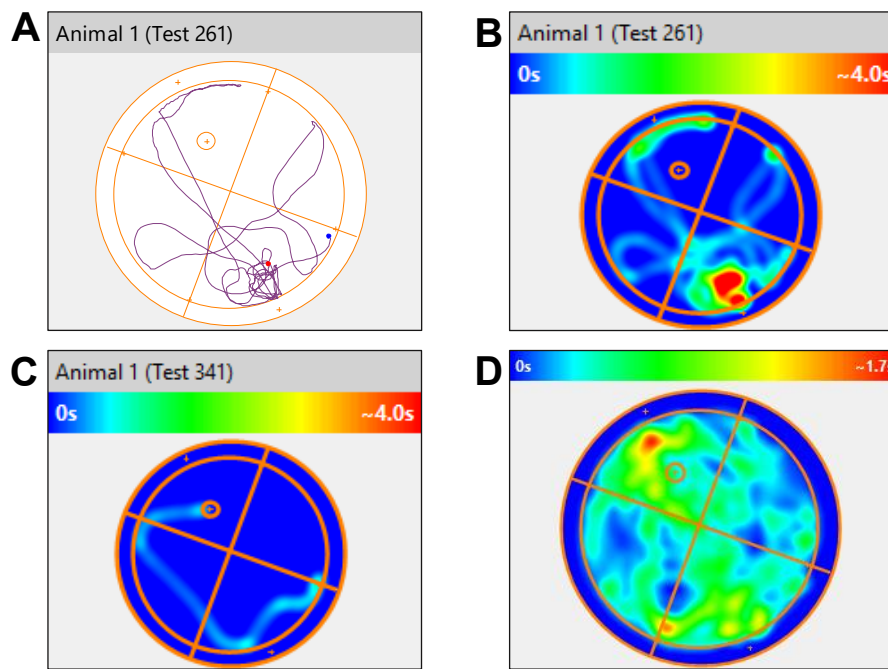


Figura 19. Tipos de mapas generados en *ANY-maze* para el laberinto acuático de Morris. Los mapas que se muestran provienen de un grupo piloto que ejecutó el mismo protocolo conductual del presente trabajo. La trayectoria de navegación en **A** y el mapa de calor en **B** del mismo ensayo, representan la estrategia de navegación de la rata 1 y el tiempo que permaneció en las zonas del laberinto, respectivamente. Para la fase de aprendizaje se utilizó la escala de calor predeterminada por *ANY-maze* (de 0 s \rightarrow ~4s); en **B** se muestra un mapa de calor de un ensayo de 90 s en el tercer día de aprendizaje y en **C** se representó un ensayo de 13.6s del mismo animal en el quinto día de aprendizaje. *ANY-maze* puede agrupar los mapas de calor por tratamiento, en **D** se muestra un mapa de calor con escala ajustada a un máximo de ~1.7, correspondiente a la evaluación de la memoria ($n=6$). *ANY-maze* versión 6.33, Laboratorio de Neurofarmacología.

Un mapa de calor es una representación gráfica de la cantidad de tiempo que pasó el animal en diferentes regiones del laberinto. El mapa de calor emplea una escala de colores para diferenciar el tiempo que pasa el animal en las diferentes áreas del laberinto, el azul (límite izquierdo) representa el tiempo más corto (0 segundos) y el rojo (límite derecho) indica el tiempo más largo (Figura 19). El

valor que se establece como rojo es aproximado (~), debido a que *ANY-maze* no puede asignar un valor exacto por la variedad de duración entre los ensayos de cada fase conductual (por ejemplo, en la fase aprendizaje o en la fase de memoria). Por ello al finalizar toda la prueba conductual, *ANY-maze* estima una escala de calor global que se aplica a todos los mapas generados; como se observa en los mapas de calor de las figuras 19 B y 19C, que corresponden al mismo animal en diferentes ensayos durante el aprendizaje.

No obstante, el experimentador puede elegir aplicar la escala de calor predeterminada por *ANY-maze* o bien asignar un valor máximo (a partir del predeterminado) que mejor se ajuste al objetivo del trabajo, por ejemplo, mostrar el mapa de calor de un solo animal (Figura 19 B y C) o bien el comportamiento de un grupo de animales (Figura 19 D).

5.8. Protocolos para la evaluación inmunohistoquímicas por fluorescencia

5.8.1. Procesamiento de cerebros

La eutanasia de los animales se realizó el día 25 posterior a la cirugía, el día siguiente a la evaluación de la memoria (Figura 12). Las ratas fueron sometidas a una sobredosis con pentobarbital sódico (90 mg/mL) i.p., para realizar la perfusión del cerebro por punción intracardiaca con 150 mL de buffer de fosfatos 0.1M (PB, 0.1M, pH 7.4) y enseguida con 20 mL de paraformaldehído al 4% en PB 0.1M (pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y colocados en frascos con paraformaldehído al 4% en PB 0.1M (pH 7.4) durante 72 horas e intercambiados a una solución de sacarosa (Sigma-Aldrich) al 15% en PB 0.1M (pH 7.4) para su almacenamiento a 4°C hasta su procesamiento.

5.8.2. Detección inmunohistoquímica de colina acetiltransferasa, acetilcolinesterasa y del factor de crecimiento nervioso

A partir de los cerebros fijados, se realizaron cortes coronales secuenciales de 40 µm de grosor correspondientes al *septum medial* (AP: -0.1 a 0.5 mm, respecto a bregma) y el hipocampo dorsal (AP: -2.6 a -4.0 mm) (Paxinos y Watson, 1998). Los tejidos se colocaron en solución de sacarosa al 15% en PB 0.1M (pH 7.4). Se destinaron 3 cortes de cada región para el análisis por inmunohistoquímica de ChAT, AChE y NGF, respectivamente.

Los cortes seleccionados se colocaron individualmente en placas de 24 pozos para el tratamiento. Se realizaron 3 lavados consecutivos de 10 min con PB- Tritón x-100 (Tx, *Sigma-Aldrich*) al 0.2%, después se incubó durante 60 min con albúmina de suero bovino libre de IgG (*Sigma-Aldrich*) al 2% en PB-Tx 0.2% y se removió con PB-Tx 0.2%, 3 lavados de 10 min. En

seguida, a los tejidos se les colocó el anticuerpo primario anti-ChAT (*Chemicon International Inc., CA, USA*), anti-AChE (*A-11: sc 373901 Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA*) o anti-NGF (*E-12: sc-365944 Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA*) (ver detalles en la tabla 3) y se almacenaron en cámara húmeda durante 48 h a 4°C. Al término de la incubación, se removió el anticuerpo primario correspondiente con PB-Tx 0.2%, 2 lavados de 10 min y se incubó durante 90 min con el anticuerpo secundario específico Rodamina-X-Red (*Jackson Immunoresearch*) o el Isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Jackson Immunoresearch*), respectivamente (Tabla 3). A continuación, se efectuaron 3 lavados con PB-Tx 0.2% de 10 min y se incubaron los tejidos durante 30 min con el marcador nuclear 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, *Sigma-Aldrich*) a una dilución 1:10000 y posteriormente se eliminó con 2 lavados con PB. Los tejidos se colocaron sobre portaobjetos silanizados, se eliminó el exceso de PB para cubrir y sellar con la mezcla de resina y protector de fluorescencia (MOWIOL+DABCO, *Sigma-Aldrich*). Se permitió el secado de la resina en completa oscuridad y las laminillas se almacenaron protegidas de la luz a 4°C, hasta su visualización por microscopia de fluorescencia.

Tabla 3. Arreglo de anticuerpos primarios y secundarios para la detección por fluorescencia de ChAT, AChE y NGF en cerebro de rata.

Anticuerpos primarios			
Marcador	Origen	Reactividad	Dilución
ChAT	Policlonal de conejo	Rata y cobayo	1:1000
AChE	Monoclonal de ratón	Ratón, rata y humano	1:100
NGF	Monoclonal de ratón	Ratón, rata y humano	1:100
Anticuerpos secundarios			
Fluorocromo acoplado	Origen	Reactividad	Dilución
Rodamina-X-Red	Cabra	Conejo	1:200
FITC	Cabra	Ratón	1:200
Rodamina-X-Red	Cabra	Ratón	1:200

5.8.3. Obtención y análisis de las imágenes por fluorescencia

La observación del marcaje fluorescente se realizó en el microscopio de fluorescencia DM 1000 LED (*Leica*) acoplado a la cámara digital (*ProgRes® C14 plus*, Figura 20). Con el filtro azul se visualizaron los núcleos, con el filtro rojo la inmunoreactividad de ChAT y NGF y con el filtro verde se identificó la inmunoreactividad a AChE. La captura de las fotomicrografías se realizó con el programa *Jenoptik Capture Pro* con el objetivo de 40X.



Figura 20. Características del microscopio de fluorescencia. En A el microscopio de fluorescencia DM 100 Led cuenta con un adaptador 1X que a su vez se acopla a la cámara ProgRes® C14 plus y el equipo utiliza como fuente de poder una lámpara de mercurio de alta intensidad. La selección de la longitud de onda se realiza con los filtros azul (DAPI; emisión a 460 nm), rojo (Rodamina-X-Red; emisión 590 nm) y verde (FITC; emisión 519 nm). A través del software *Jenoptik Capture Pro* se lleva a cabo la toma de fotomicrografías. Laboratorio de Neurofarmacología.

El análisis histológico consistió en la cuantificación del porcentaje de inmunoreactividad a ChAT, AChE o NGF (ir-ChAT, ir-AChE o ir-NGF) con una macro ejecutada en *Image J*. De acuerdo con el tamaño de la fotografía (1360x1024 pxl) y al aumento en que se capturó la imagen (40x) se utilizó la calibración de 1 pxl= 0.147 μ m para todas las fotomicrografías, mientras que los umbrales se establecieron con 5 fotomicrografías al azar con cada marcador, para ChAT; 23, para AChE; 17 y para NGF;15, de modo que se detectó únicamente la marca fluorescente (Figura 21).

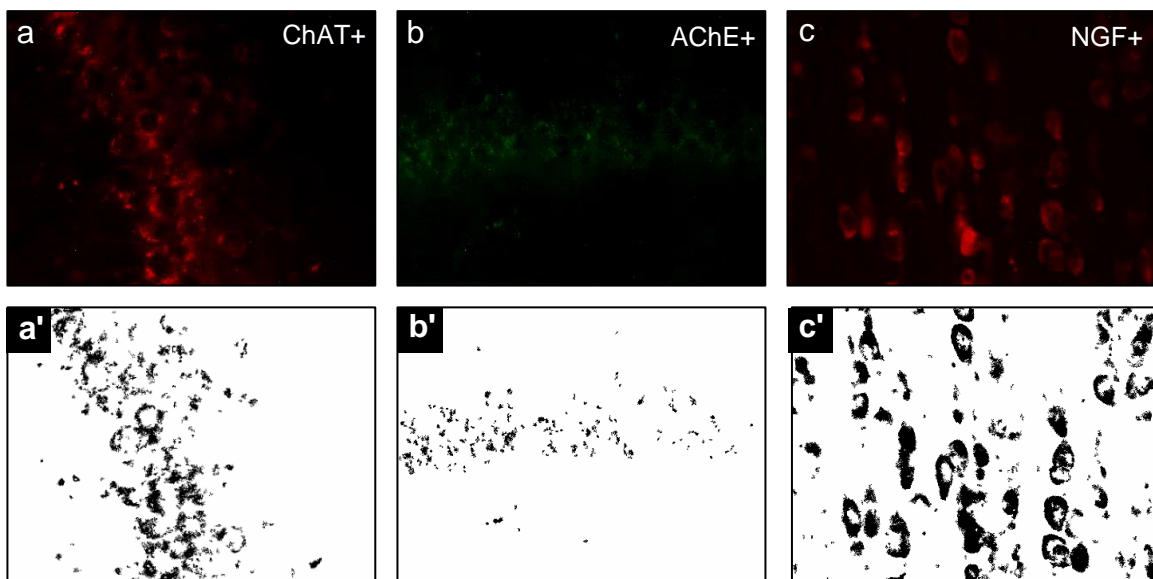


Figura 21. Identificación del área con inmunoreactividad a través de máscaras. En la fila superior se muestra la marca positiva para ChAT (a) en la región CA3, para AChE (b) en la región CA1 y en para NFG (c) en *septum medial* y en la fila inferior se indica la máscara correspondiente a cada marcador. A través de *Image J* se generaron las máscaras a', b' y c', en las que la señal en negro corresponde únicamente a la fluorescencia que se observa en las fotografías a, b y c.

5.9. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó en el programa *GraphPad Prism versión 8.0.1*. Se representó el valor \pm el error estándar de la media (EEM).

Los valores del perfil zoométrico, de la ingesta calórica y los marcadores en suero fueron sometidos a la prueba de normalidad D' Agostino considerando un intervalo de confianza del 95% y posteriormente se aplicó la prueba estadística correspondiente;

- Los parámetros zoométricos y de consumo, se analizaron con t-student apareada.
- La curva de tolerancia a la glucosa se analizó con ANOVA de una vía y post-test Bonferroni.
- Los niveles de insulina, glucosa y triglicéridos se analizaron con una t-student no apareada.
- Los niveles de colesterol total y colesterol HDL se analizaron con la prueba Mann-Whitney.

Los parámetros de aprendizaje se analizaron con ANOVA de dos vías y post test Bonferroni.

Los parámetros de la memoria se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis y posttest de Dunns.

El porcentaje de área teñida para la ir-ChAT, ir-AChE e ir-NGF se analizó con Kruskal-Wallis y post test de Dunns.

6. Resultados

6.1. El consumo de sacarosa produce un modelo experimental de síndrome metabólico

El modelo experimental de SMet se obtuvo mediante el consumo *ad libitum* de una solución de sacarosa al 20% durante 180 días.

En el transcurso del experimento se registró el aporte energético (Figura 37 B) a partir del consumo diario de alimento, agua o solución de sacarosa al 20% (Figura 38). En el primer día de exposición a los regímenes dietéticos, el grupo SMet *inicial* consumió significativamente menos gramos de alimento (52%, $p < 0.001$) que el grupo Control *inicial*, sin embargo, se observó un incremento significativo en el consumo de solución de sacarosa al 20% (90%, $p < 0.001$) comparado con el consumo de agua en el grupo Control *inicial*, sin mostrar diferencias en la ingesta calórica total entre el grupo Control *inicial* y SMet *inicial* (Tabla 4). En el curso del experimento se observó un comportamiento de consumo similar (Figura 38) no obstante, el grupo SMet *inicial* incrementó gradualmente la ingesta de alimento y de solución de sacarosa al 20%, evidenciando un consumo calórico total significativamente mayor (10%, $p < 0.001$) respecto al grupo Control *inicial* en el día 180 de tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de la ingesta calórica al inicio y término el periodo de inducción

Determinación energética	Día 1		Día 180	
	Control <i>inicial</i>	SMet <i>inicial</i>	Control <i>inicial</i>	SMet <i>inicial</i>
Consumo de Rodent diet (g/día)	21±0.3	11±0.7***	19±0.7	12±0.5***
Consumo de agua/solución sacarosa al 20% (g/día)	34±1.5	65±5.0***	40±2.0	59±2.7**
Ingesta calórica total (kcal/día)	65±1.0	69±1.4	59±2.3	84±2.5***

Cuantificación de la ingesta de alimento, agua o solución de sacarosa al 20% y el consumo energético en los grupos Control *inicial* y SMet *inicial* en el día 1 y 180 de tratamiento. Se muestran los valores promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó con t-student con valor de *** $p < 0.001$ respecto al Control *inicial* en el día 1, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al Control *inicial* en el día 180.

Debido a que el consumo excesivo de calorías conduce a la acumulación de tejido adiposo en los roedores, se evaluaron los cambios zoométricos que puede generar el consumo de la solución de sacarosa al 20% a largo plazo.

Al inicio del experimento el grupo Control inicial y del grupo SMet inicial mostraron valores zoométricos similares ($p>0.05$). En el transcurso del periodo de inducción, se observó la ganancia de peso corporal constante en todos los animales (Figura 37 A) sin embargo, en el día 180 de tratamiento el grupo que consumió la solución de sacarosa al 20% evidenció un incremento significativo del peso corporal (17%, $p<0.001$), de la circunferencia abdominal (16%, $p<0.001$), del IMC (13%, $p<0.001$), sin cambios significativos en la longitud corporal ($p>0.05$), en comparación al grupo Control inicial al término del periodo de inducción (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación del perfil zoométrico inicial y al día 180 de tratamiento

Parámetro zoométrico	Día 0		Día 180	
	Control inicial	SMet inicial	Control inicial	SMet inicial
Peso (g)	273 ± 3.5	278 ± 3.2	401 ± 9***	469 ± 11%%%,&&&
Circunferencia abdominal (cm)	16 ± 0.1	16 ± 0.1	18 ± 0.3**	21 ± 0.3%%%,&&&
Índice de masa corporal (kg/m ²)	6 ± 0.07	6 ± 0.06	6.8 ± 0.1***	7.7 ± 0.1%%%,&&&
Longitud corporal (cm)	21 ± 0.2	21 ± 0.1	24 ± 0.1**	24 ± 0.1%%%

Comparación de los valores de peso corporal, circunferencia abdominal, IMC y longitud corporal en los grupos Control inicial ($n=30$) y SMet inicial ($n=37$) de inicio y en el día 180 de tratamiento. Los valores representan el promedio ± EEM. El análisis estadístico se realizó con t-student con valor de ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ vs Control inicial en el día 1, %%% $p<0.001$ respecto al SMet inicial en el día 1, &&& $p<0.001$ respecto al Control inicial en el día 180.

Los cambios morfológicos que produce el consumo de la solución de sacarosa al 20% durante 180 días, se apreciaron principalmente en la acumulación de tejido adiposo en la región abdominal, como se muestra en la figura 22.

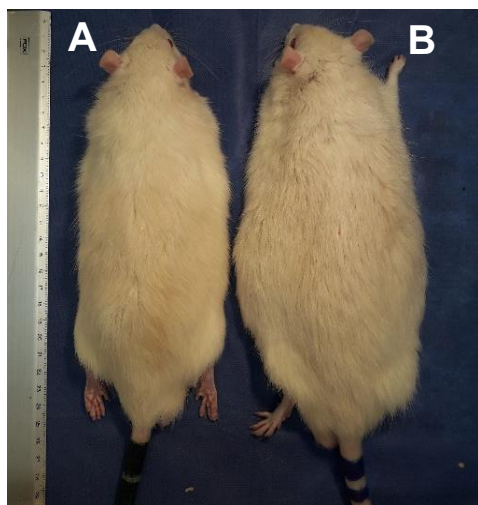


Figura 22. El consumo de sacarosa produce acumulación de tejido adiposo abdominal en rata Wistar. Se muestra una fotografía comparativa a los 180 días de seguimiento en la que se muestra en **A** una rata Control inicial y en **B** una rata inducida a SMet inicial.

En seguimiento a la caracterización del modelo de SMet, se determinó el perfil metabólico después de 180 días de tratamiento. En la curva de tolerancia a la glucosa el grupo SMet_{inicial} mostró una evidente intolerancia a la glucosa debido a que se observó que a partir de los 15 min de la administración de glucosa i.p., el grupo SMet_{inicial} evidenció un incremento significativo del 44% ($p < 0.001$) en la concentración de glucosa en sangre respecto al grupo Control_{inicial}, además este comportamiento se mantuvo en los siguientes periodos evaluados; a los 30 min (40%, $p < 0.001$), 60 min (34%, $p < 0.001$), 90 min (39%, $p < 0.001$), 120 min (37%, $p < 0.001$) y 180 min (30%, $p < 0.05$), comparados con los periodos respectivos del grupo Control_{inicial} (Figura 23 A).

Además, el consumo de sacarosa al 20% durante 180 días, generó un incremento significativo del 109% en los niveles de insulina del grupo SMet_{inicial} ($p < 0.01$) comparado con el grupo Control_{inicial} (Figura 23 B). En seguimiento a las evaluaciones en suero, el grupo SMet_{inicial} también mostró un aumento significativo del 43% en la concentración de glucosa ($p < 0.001$, Figura 23 C) y un incremento significativo del 148% en la concentración de triglicéridos ($p < 0.001$, Figura 23 D), ambas determinaciones comparadas con el grupo Control_{inicial}. Por otro lado, no se evidenciaron cambios en las determinaciones de colesterol total (Control_{inicial}: 49.6 ± 2.3 mg/dL, SMet_{inicial}: 47.4 ± 1.7 mg/dL, Figura 23 E) y colesterol HDL (Control_{inicial}: 30.4 ± 1.6 mg/dL, SMet_{inicial}: 30.9 ± 1.3 mg/dL, Figura 23 F).

El análisis minucioso del perfil zoométrico y metabólico de cada animal experimental, permitió incluir al grupo experimental SMet_{inicial} únicamente a aquellas ratas que, expuestas a la dieta con sacarosa desarrollaron al menos tres de las siguientes alteraciones metabólicas: obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, glucosa alterada en ayuno o hipertrigliceridemia. En consideración a los criterios internacionales que definen al SMet, así como a los reportes experimentales sobre SMet, con lo anterior se estableció y aplicó el criterio para indicar que un animal desarrolló SMet en el presente trabajo experimental.

Una vez establecidos los grupos Control_{inicial} y SMet_{inicial} al término del periodo de inducción, cada grupo inicial se dividió aleatoriamente en dos subgrupos para realizar la administración bilateral de $1 \mu\text{L}$ de SSI o los agregados del $A\beta_{25-35}$ ($100 \mu\text{M}$) en la región CA1 del hipocampo, de modo que se generaron los siguientes grupos experimentales: Control, SMet, $A\beta_{25-35}$ y SMet+ $A\beta_{25-35}$.

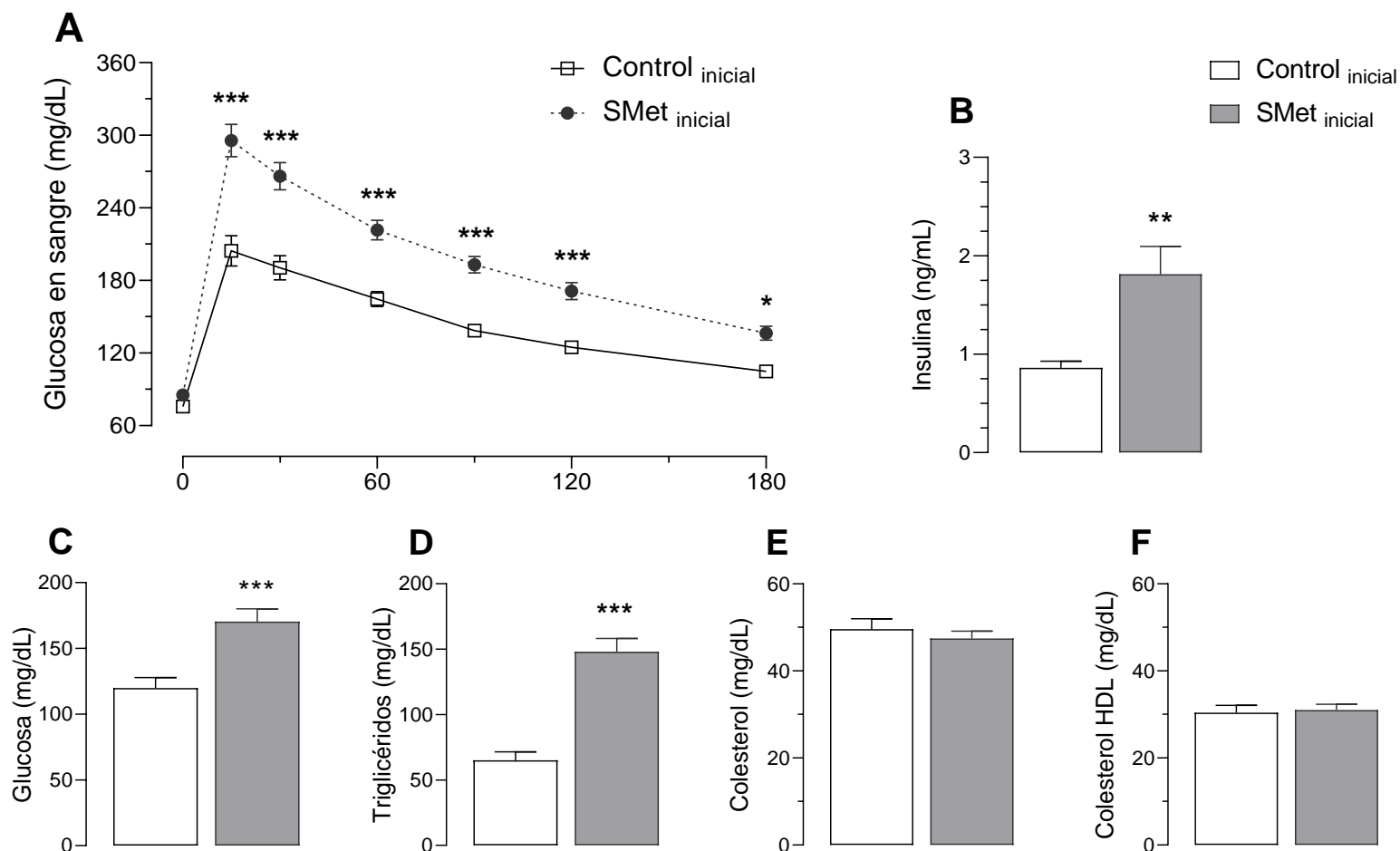


Figura 23. La ingesta de sacarosa al 20% durante 180 días produce intolerancia a la glucosa e incrementa los niveles de insulina, glucosa y triglicéridos en suero de ratas Wistar. Los grupos Control_{inicial} y el grupo SMet_{inicial} se mantuvieron en ayuno de 12 horas para la evaluación de los parámetros metabólicos. Posterior a la administración i.p. de 2 g de glucosa/kg de peso, se graficó en **A** la concentración de glucosa en sangre a los 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos (Control_{inicial} $n=30$; SMet_{inicial} $n=37$). Se muestra en **B** la concentración de insulina (Control_{inicial} $n=11$; SMet_{inicial} $n=16$), en **C** la concentración de glucosa, en **D** de triglicéridos, en **E** de colesterol total y en **F** del colesterol HDL (Control_{inicial} $n=30$; SMet_{inicial} $n=37$). En **A** se analizó con ANOVA de dos vías y post-test Bonferroni con valores de $*p<0.05$ y $***p<0.001$ respecto al Control_{inicial}. En **B**, **C**, **D** se analizó con t-student considerando valores de $**p<0.01$ y $***p<0.001$ comparado con el Control_{inicial}. En **E** y **F** se analizó con Mann-Whitney considerando un valor de $p<0.05$ respecto al Control_{inicial}. Las gráficas representan el promedio \pm EEM.

6.2. El síndrome metabólico no interfiere en el aprendizaje de ratas lesionadas con el péptido A β_{25-35}

La evaluación del aprendizaje espacial se realizó del día 15 al 19 posterior a la cirugía estereotáxica (Figura 12). En la figura 24 se muestra el promedio de la latencia al escape de los 4 ensayos diarios. En el día 15 posterior a la cirugía todos los grupos evidenciaron latencias al escape similares; Control: 63.4 ± 4.1 s, SMet: 67.0 ± 3.9 s, A β_{25-35} : 67.1 ± 3.9 s y SMet+A β_{25-35} : 67.0 ± 3.4 s, en los días siguientes la latencia disminuyó gradualmente y en el último día todos los grupos experimentales terminaron la prueba en un tiempo semejante, el grupo Control localizó la plataforma en 20.9 ± 3.3 s, mientras que los grupos SMet, A β_{25-35} y SMet+A β_{25-35} hallaron la plataforma en 24.8 ± 4.2 s, 22.0 ± 3.7 s y 24.5 ± 3.8 s, respectivamente. El análisis estadístico no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales durante en el proceso de adquisición ($p > 0.05$, Figura 24).

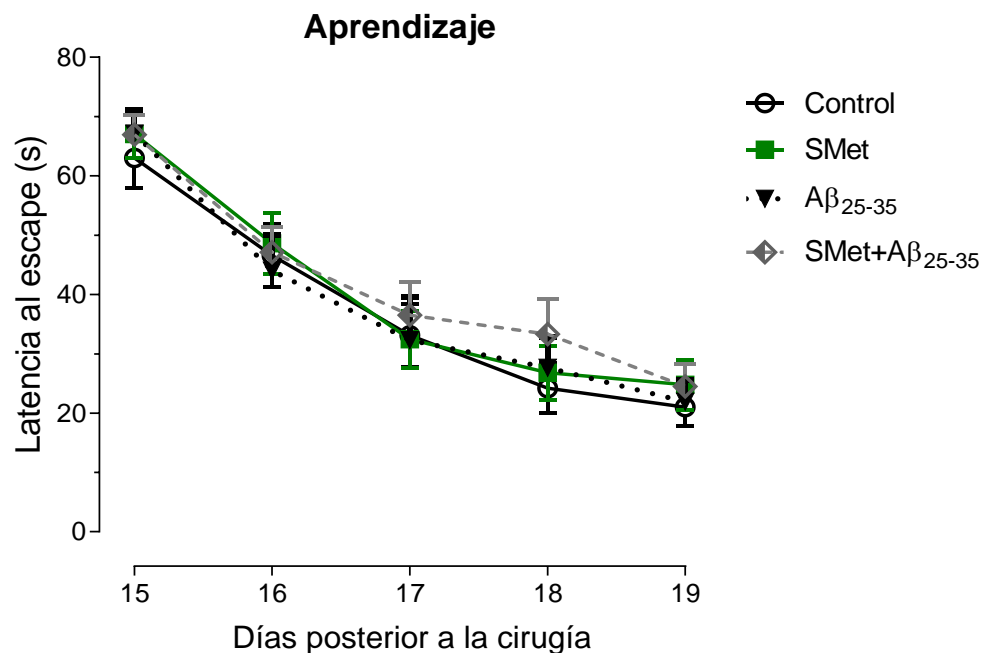


Figura 24. El síndrome metabólico no daña el aprendizaje espacial en ratas lesionadas con el A β_{25-35} en la región CA1 del hipocampo. Durante el aprendizaje los grupos Control ($n=16$), SMet ($n=19$), A β_{25-35} ($n=14$) y SMet+A β_{25-35} ($n=18$) ingresaron al laberinto acuático de Morris y ejecutaron 4 ensayos diarios en el transcurso del 15 al 19 posterior a la cirugía estereotáxica. Se graficó el promedio \pm EEM de los 4 ensayos diarios de la latencia al escape. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de dos vías y post test Bonferroni considerando un valor de $p < 0.05$.

Relacionado a la latencia al escape, también se analizó la distancia recorrida hasta localizar la plataforma de escape y la velocidad con que se ejecutaron los ensayos (Figura 39). Los registros mostraron que la distancia que navegaron los animales para llegar a la plataforma de escape disminuyó progresivamente en el transcurso de la prueba, de modo que al comparar el desempeño obtenido en el último día de aprendizaje, el grupo control logró reducir la distancia de recorrido en un 71% respecto al primer día en que ingresó al LAM, mientras que el grupo SMet la disminuyó en un 63% y los grupos $A\beta_{25-35}$ y SMet+ $A\beta_{25-35}$ redujeron su recorrido en un 74 y 67%, respectivamente (Figura 39 A), sin embargo no se encontraron cambios estadísticamente significativos entre los grupos a través de los días ($p>0.05$).

Con respecto a la velocidad promedio, disminuyó progresivamente y al final de la prueba se observó una disminución del 21% en grupo Control _{inicial} comparada con su desempeño en el primer día, de manera similar se observó esta disminución en los grupos SMet (15%), $A\beta_{25-35}$ (25%) y SMet+ $A\beta_{25-35}$ (25%) (Figura 39 B),

Estos resultados indican que el SMet+ $A\beta_{25-35}$ no dañan el aprendizaje evaluado en el LAM sin embargo, fue necesario analizar las trayectorias de navegación que realizaron los animales y obtener información a detalle sobre el proceso de adquisición.

6.3. Trayectorias de navegación y los mapas de calor durante el aprendizaje

En la figura 25 se muestran las trayectorias de navegación representativas a cada grupo experimental y en la figura 26 un panel con los mapas de calor correspondientes a cada grupo experimental.

En el primer día de aprendizaje todas las ratas recorrieron exclusivamente la periferia de la tina guiadas por el límite de la pared, es decir ejecutaron trayectorias de tigmotaxis con cruces esporádicos hacia el centro de la tina, sin embargo, no lograron localizar la plataforma en la mayoría de los ensayos (Figura 25 a, b, c y d). El análisis agrupado indicó que la zona en donde permanecieron navegando la mayor del tiempo fue la periferia de la tina, como se indica en la zona en rojo de los mapas de calor en todos los grupos experimentales (Figura 26 a, b, c y d).

En los ensayos de los días siguientes la tigmotaxis disminuyó y las ratas aprendieron a redireccionar la búsqueda de la plataforma tocando las paredes o incursionando (Figura 25 e, f, h, i), con recorridos circulares y repetitivos (en cadena) que les permitieron localizar la plataforma (Figura 25 g, j, k), también ejecutaron trayectorias de búsqueda en zona específica en la que permanecieron en regiones distintivas para orientar la navegación, por ejemplo a través de las señales intralaberínticas (Figura 25 l, n, ñ y q) o bien realizaron giros para orientarse por sí mismos (Figura 25 j, m, p, q y r) hasta reducir la trayectoria recorrida en el día 19 posterior a la cirugía.

Respecto a los mapas de color, se observó que todos los grupos disminuyeron el tiempo que navegaron en el laberinto, debido a que las ratas aprendieron a localizar la plataforma de escape en un menor tiempo (Figura 26). Específicamente se observó que el grupo Control permaneció la mayor parte del tiempo en el cuadrante blanco (sitio donde se encontraba la plataforma) en los últimos días de la prueba de aprendizaje (Figura 26 m y p), mientras que el grupo SMet continuó visitando la periferia de la tina (Figura 26 j y n) y realizó búsqueda en el cuadrante contrario al de la plataforma (Figura 26 q), similar al grupo $A\beta_{25-35}$ (Figura 26 ñ y r), sin embargo el grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$, fue el que mostró la mayor persistencia en la periferia de la tina (Figura 26 l y o) además de navegar aleatoriamente en toda la zona del laberinto al final de la prueba de aprendizaje (Figura 26 s).

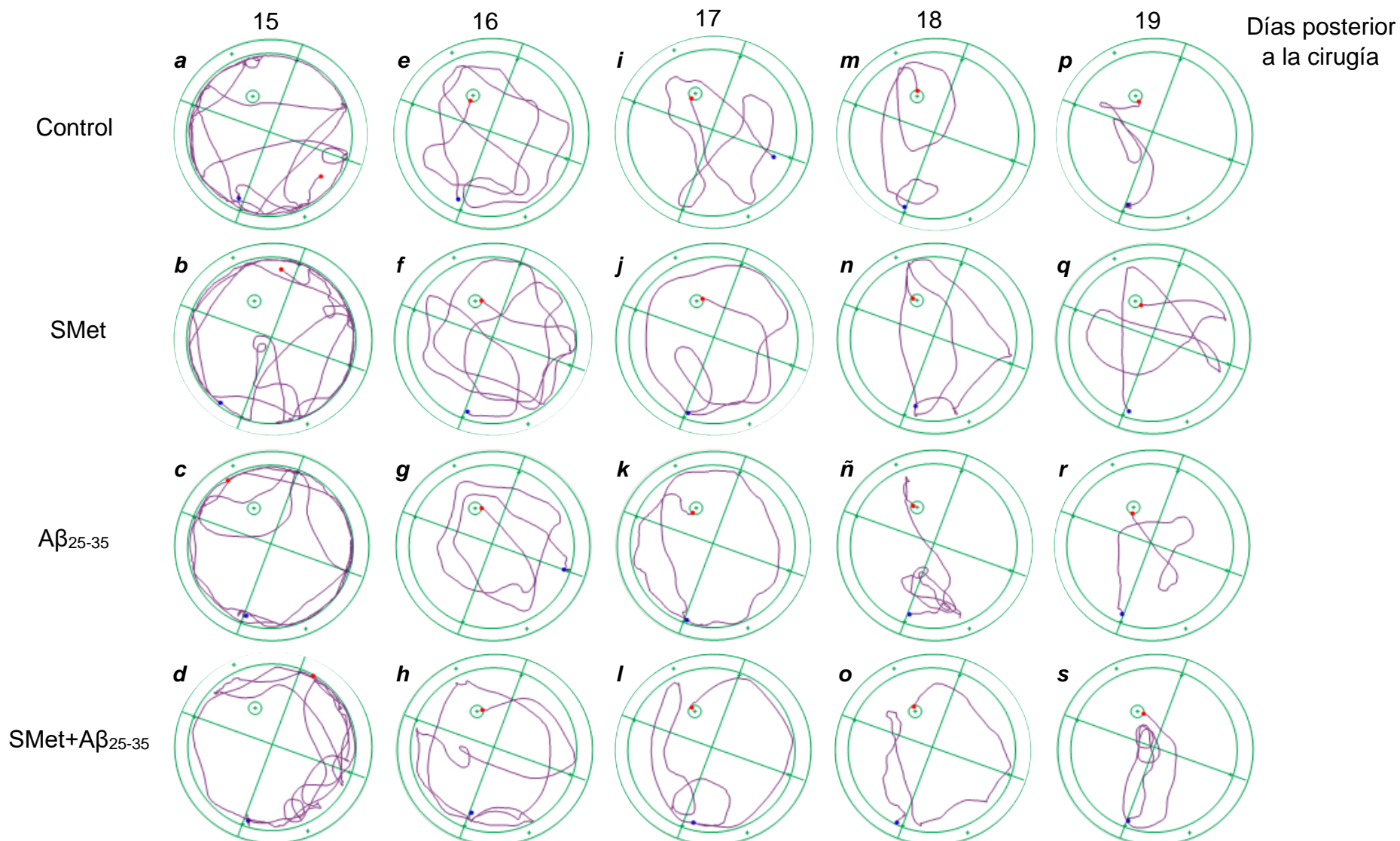


Figura 25. Trayectorias de navegación durante el aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris. Se muestran las trayectorias de navegación representativas para el primer ensayo durante los 5 días de aprendizaje en los grupos Control, SMet, $A\beta_{25-35}$ y SMet+ $A\beta_{25-35}$. Los círculos más grandes delimitan el plano del laberinto y el más pequeño indica la localización de la plataforma de escape, las líneas señalan la división de los cuadrantes y los puntos entre los círculos indican las señales intralaberínticas. El inicio de la trayectoria se marca con un punto azul, el recorrido se indica con la línea en violeta y el término del ensayo con un punto rojo (la llegada a la plataforma o el tiempo máximo del ensayo).

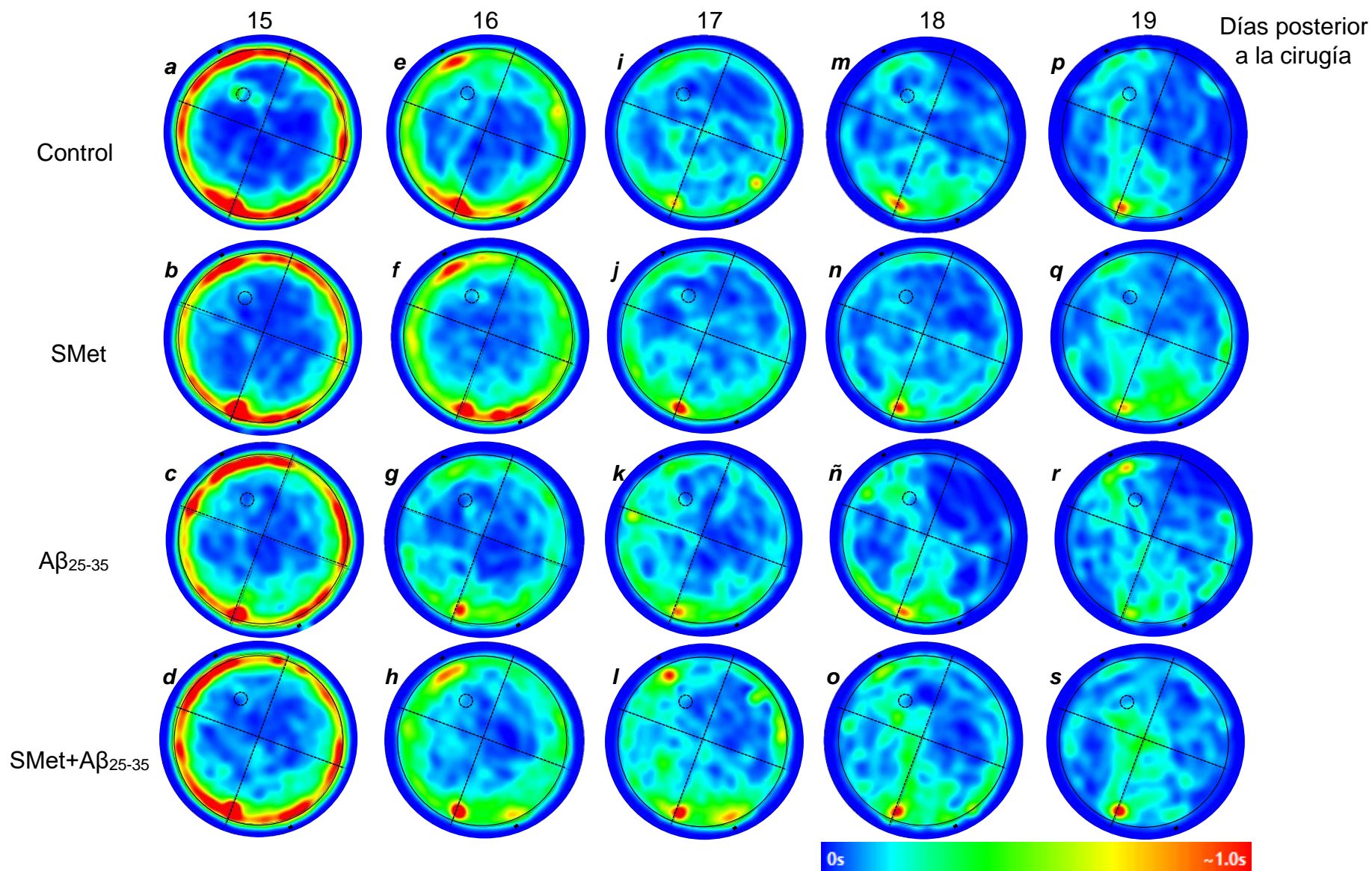


Figura 26. Mapas de calor durante el aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris. Se muestran los mapas de calor correspondientes a los grupos Control ($n=16$), SMet ($n=19$), A β_{25-35} ($n=14$) y SMet+A β_{25-35} ($n=18$), obtenidos durante el primer ensayo diario del aprendizaje. Se estableció la escala de calor de 0s a 1s, el extremo izquierdo en azul oscuro (color más frío) se indican las zonas no visitadas (0 s) y en el derecho en rojo las regiones donde permanecieron más tiempo los animales (color más cálido) (~1.4 s) durante todo el protocolo de aprendizaje.

6.4. El síndrome metabólico no incrementa el daño en la memoria producido por el A β ₂₅₋₃₅

La memoria espacial se evaluó el día 24 posterior a la cirugía, la plataforma de escape se excluyó del LAM y los animales ejecutaron un solo ensayo. En la figura 27 A se muestra que la latencia a la primera visita a la zona de la plataforma, incrementó significativamente en los grupos SMet (53 ± 7.8 s, $p < 0.01$), A β ₂₅₋₃₅ (46.0 ± 8.2 s, $p < 0.05$) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (49.0 ± 8.7 s, $p < 0.05$) respecto al grupo Control (14.0 ± 2.3 s), lo cual correlacionó con los recorridos más largos en los mismos grupos (A β ₂₅₋₃₅: 7.1 ± 1.3 m, SMet: 9.8 ± 1.6 m, SMet+A β ₂₅₋₃₅: 7.9 ± 1.6 m) respecto al grupo Control (2.3 ± 0.4 m, Figura 39 A). Los resultados anteriores se sustentan con las estrategias de navegación, debido a que un recorrido corto en una rata Control corresponde a un nado dirigido con estrategias de orientación propia (Figura 27 a), mientras que en los tratamientos A β ₂₅₋₃₅, SMet y SMet+A β ₂₅₋₃₅ prevalecen estrategias de búsqueda en zona específica (Figura 27 b), recorridos circulares repetitivos e incursión (Figura 27 c) inclusive búsqueda aleatoria en toda el área de la tina (Figura 27 d), respectivamente.

El análisis de la dinámica en el cuadrante blanco evidenció una disminución significativa en el número de cruces a la zona de la plataforma en los grupos SMet (1.2 ± 0.2 , $p < 0.001$) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (1.3 ± 0.3 , $p < 0.001$), respecto al grupo Control (Figura 27 B) a pesar de haber registrado un número de visitas y un tiempo de navegación (en el cuadrante blanco) similar en todos los grupos experimentales (Figura 40). Los hallazgos anteriores son más claros al observar los mapas de calor. En el grupo Control se observó que el nado se mantuvo en el sitio exacto donde se encontraba la plataforma (color naranja en la zona de la plataforma) y que su navegación se orientó mediante las señales intralaberínticas (Figura 27 a'), en tanto el grupo SMet y A β ₂₅₋₃₅ exploraron persistentemente el cuadrante contrario al cuadrante blanco (Figura 27 b' y c') y el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ mostró un nado periférico a la zona de la plataforma, sin éxito para recordar el sitio exacto donde se encontraba la plataforma (Figura 27 d').

Por otro lado, se descartó incapacidad motora para ejecutar la prueba debido a que no se encontraron diferencias significativas en la velocidad con que los grupos experimentales ejecutaron la prueba; Control= 0.18 ± 0.01 m/s, SMet= 0.19 ± 0.01 m/s, A β ₂₅₋₃₅= 0.17 ± 0.01 m/s y SMet+A β ₂₅₋₃₅= 0.16 ± 0.01 m/s (Figura 39 B).

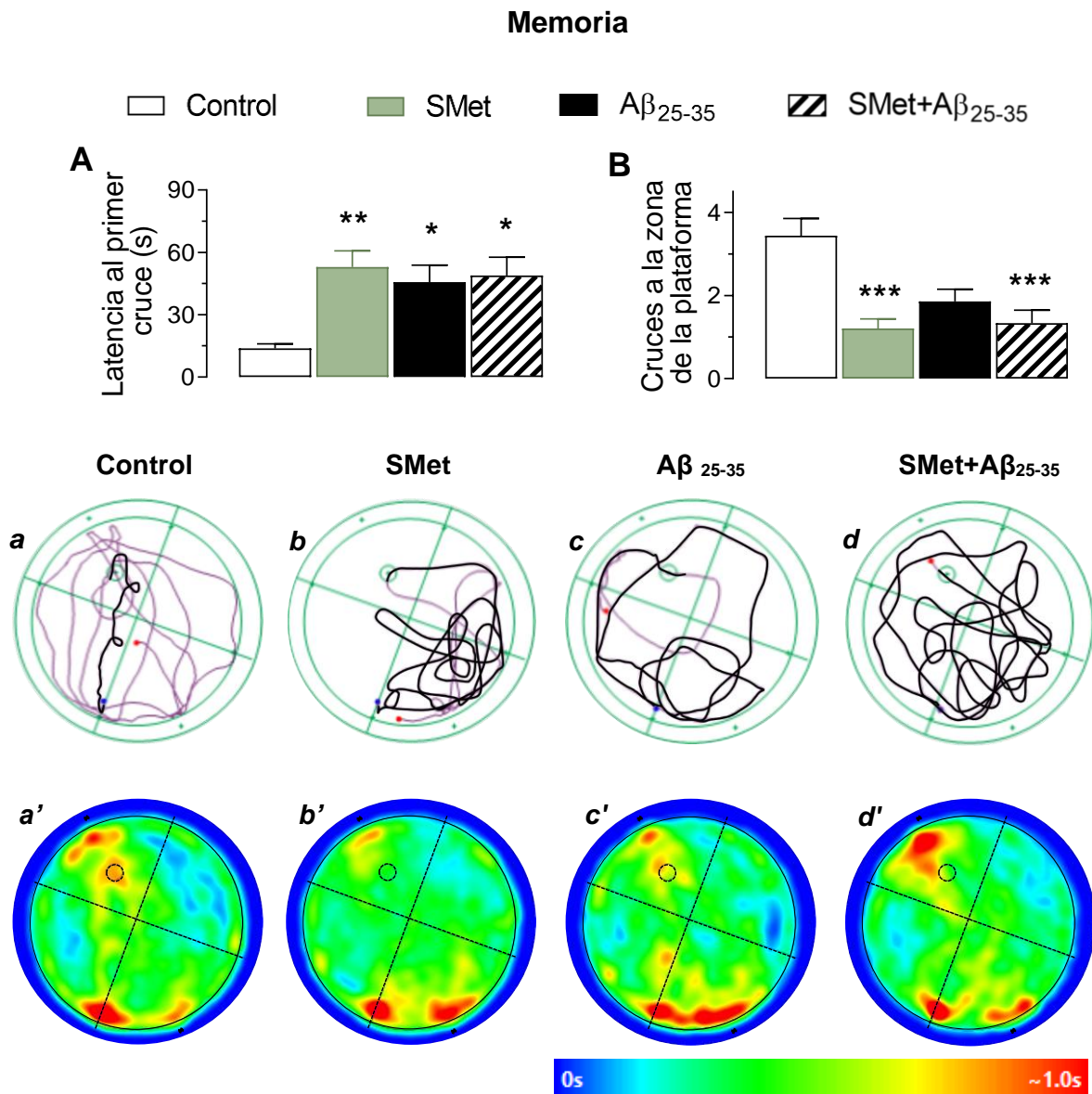


Figura 27. El síndrome metabólico y la lesión con el $A\beta_{25-35}$ dañan la navegación espacial durante la prueba de memoria. El día 24 posterior a la cirugía se evaluó en la memoria de los grupos Control ($n=16$), SMet ($n=19$), $A\beta_{25-35}$ ($n=14$) y SMet+ $A\beta_{25-35}$ ($n=18$) en un solo ensayo, en **A** la latencia al primer cruce y en **B** el número de cruces a la zona de la plataforma. Se representó el promedio \pm EEM. Se analizó con la prueba Kruskal-Wallis y post-test Dunns considerando $*p<0.05$, $**p<0.01$ $**p<0.001$ respecto al Control. Se muestran las trayectorias representativas a la prueba de memoria en **a**, **b**, **c** y **d**, la línea negra resalta la trayectoria al primer cruce a la zona de la plataforma. Los mapas de calor corresponden al único ensayo de 90 s de los grupos Control ($n=16$), SMet ($n=19$), $A\beta_{25-35}$ ($n=14$) y SMet+ $A\beta_{25-35}$ ($n=18$). La escala de calor se estimó a partir del único ensayo e inicia en azul que corresponde a un tiempo de 0s s y a la derecha en rojo se asignó un valor de ~ 1 s de acuerdo con ANY-maze 6.2.

Al día siguiente de la evaluación de la memoria, se obtuvieron los cerebros de todos los grupos experimentales para evaluar los marcadores ChAT, AChE y NGF en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y el Giro Dentado (GD), en el *septum medial* y la vDBB mediante inmunohistoquímica por fluorescencia.

6.5. El síndrome metabólico más la lesión con el A β ₂₅₋₃₅ no incrementó la pérdida de colina acetiltransferasa en la vía septo-hipocampo

En las figuras 28 y 29 se muestran las fotomicrografías representativas a la inmunoreactividad a ChAT (ir-ChAT) y la correspondiente co-localización con los núcleos, para las regiones de la vía septo-hipocampo (CA1, CA3, GD, *septum medial* y vDBB) en cada grupo experimental. La marca positiva a ChAT se observó en rojo (Rodamina), con una distribución difusa en el citoplasma y periférica al núcleo (Figura 28 a' - l'). En cuanto al *septum medial* y la región vDBB la ir-ChAT evidenció la morfología neuronal en forma de gota (Figura 29 a' - h').

El análisis cuantitativo del área teñida con ir-ChAT en la CA1 del hipocampo, mostró una disminución estadísticamente significativa en los grupos A β ₂₅₋₃₅ (0.88 ± 0.1 , $p < 0.001$), SMet (1.8 ± 0.3 , $p < 0.01$) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (1.3 ± 0.17 , $p < 0.01$) comparados con el grupo Control (3.1 ± 0.25 , figura 30 B). En la región CA3 del hipocampo se encontró una disminución significativa en los grupos A β ₂₅₋₃₅ (1.1 ± 0.16 , $p < 0.001$), SMet (1.9 ± 0.2 , $p < 0.01$) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (1.7 ± 0.17 , $p < 0.01$) respecto al grupo Control (3.1 ± 0.23 , figura 30 C). La cuantificación del área con ir-ChAT en el GD también disminuyó en los grupos A β ₂₅₋₃₅ (0.77 ± 0.1 , $p < 0.001$), SMet (1.3 ± 0.12 , $p < 0.001$) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (1.5 ± 0.15 , $p < 0.001$) comparados con el grupo Control (2.9 ± 0.25 , Figura 30 D).

En relación con la inervación colinérgica que recibe el hipocampo del cerebro basal anterior, se continuó con la evaluación en el *septum medial* y la vDBB. En el *septum medial* se encontró que el área con ir-ChAT disminuyó significativamente en los grupos A β ₂₅₋₃₅ (1.8 ± 0.13 , $p < 0.01$) y SMet (1.8 ± 0.25 , $p < 0.001$), comparados con el grupo Control (3.3 ± 0.36 , Figura 30 F). En la misma región el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ (2.0 ± 0.14) también disminuyó en la ir-ChAT respecto al grupo Control (3.3 ± 0.36) sin embargo, no fue estadísticamente significativo (Figura 30 F). En cuanto a la región vDBB, la ir-ChAT disminuyó significativamente en los grupos A β ₂₅₋₃₅ (1.8 ± 0.17 , $p < 0.001$) y SMet 0.89 ± 0.07 , $p < 0.01$) comparados con el grupo Control (3.3 ± 0.36 , Figura 30 G).

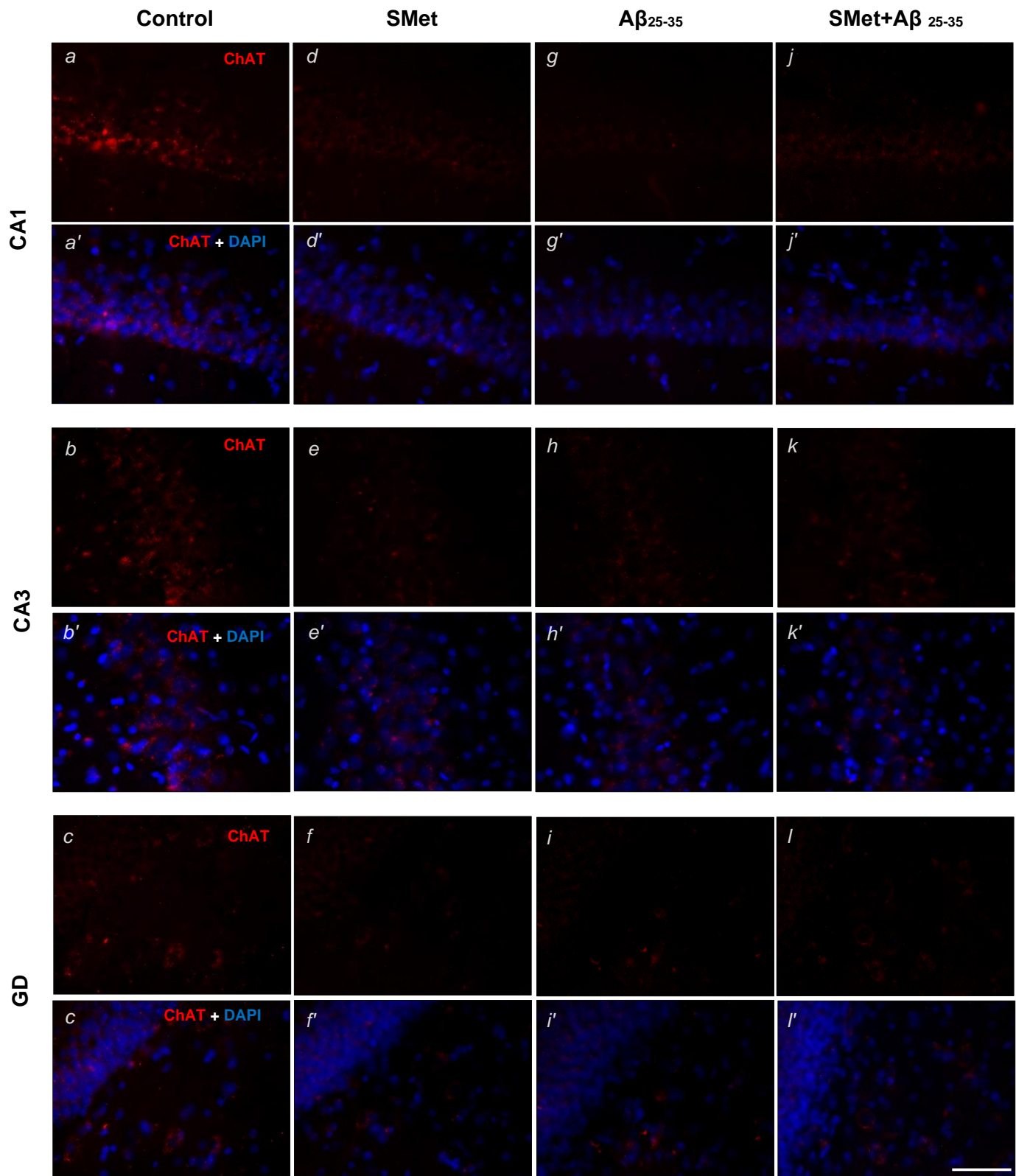


Figura 28. El síndrome metabólico no modificó la expresión de ChAT en hipocampo de ratas lesionadas con el A β_{25-35} . Se muestran fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad a ChAT (rojo, a - l) y el empalme con los núcleos (azul, a' - l') en las regiones CA1, CA3 y GD, para cada grupo experimental. Magnificación a 40X. Barra=50 μ m.

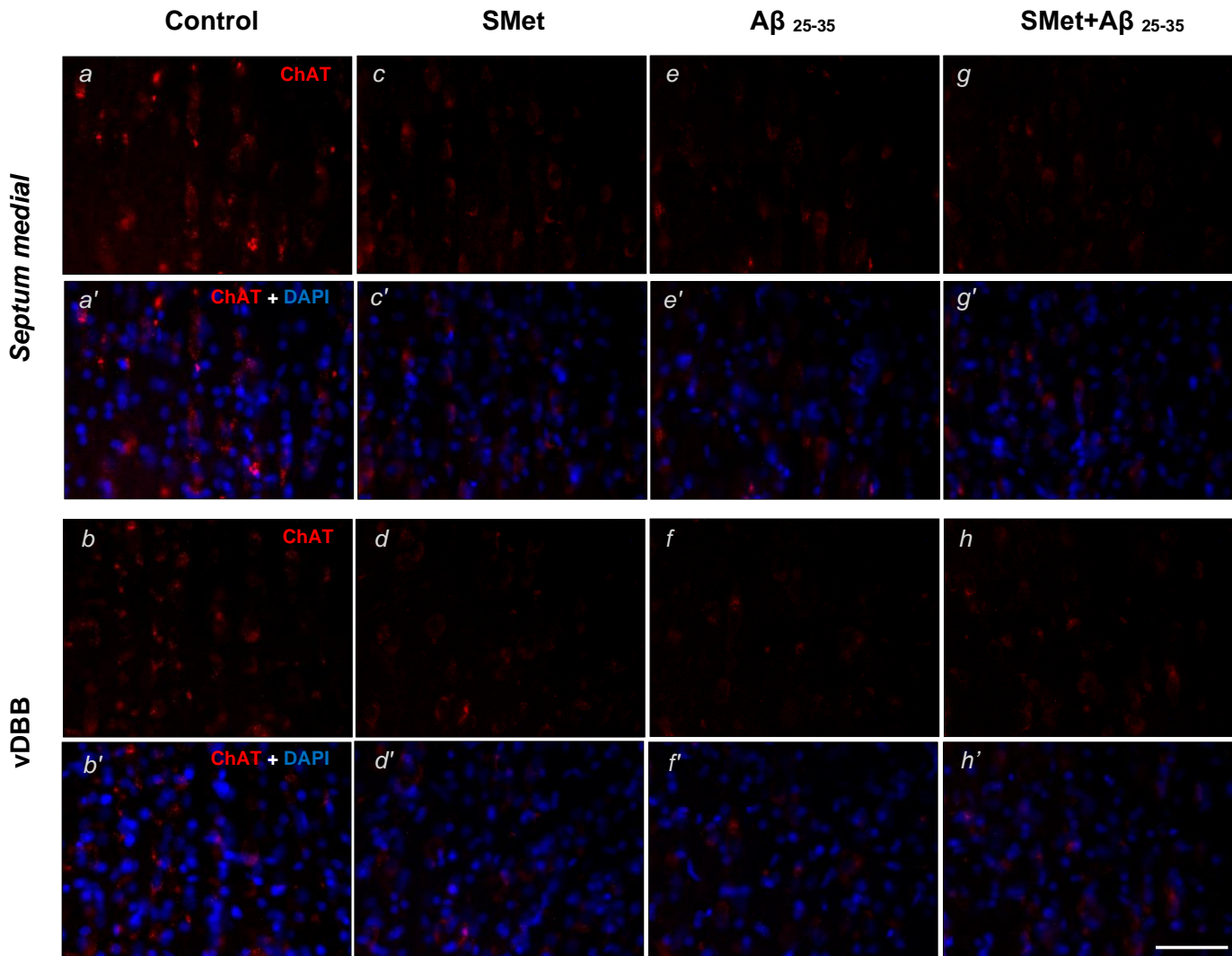


Figura 29. El síndrome metabólico no modificó la expresión de ChAT en *septum medial* de ratas lesionadas con el $A\beta_{25-35}$. Se muestran fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad a ChAT (rojo, a - h) y el empalme con los núcleos (azul, a' -h') en el *septum medial* y la vDBB para cada grupo experimental. Magnificación a 40X. Barra=50 μ m

En conjunto a lo anterior, el análisis estadístico también mostró que la ir-ChAT en la región CA1 es significativamente mayor en los grupos SMet (104%, $p < 0.01$) y SMet+A β_{25-35} (47%, $p < 0.01$) respecto al grupo A β_{25-35} . Este comportamiento también se evidenció en la región CA3 (SMet= 72%, $p < 0.001$; SMet+A β_{25-35} = 54%, $p < 0.01$), GD (SMet= 69%, $p < 0.001$; SMet+A β_{25-35} = 94%, $p < 0.001$) y en la región vDBB (SMet= 102%, $p < 0.01$; SMet+A β_{25-35} = 147%, $p < 0.001$), comparado con el grupo Control, respectivamente (Figura 30).

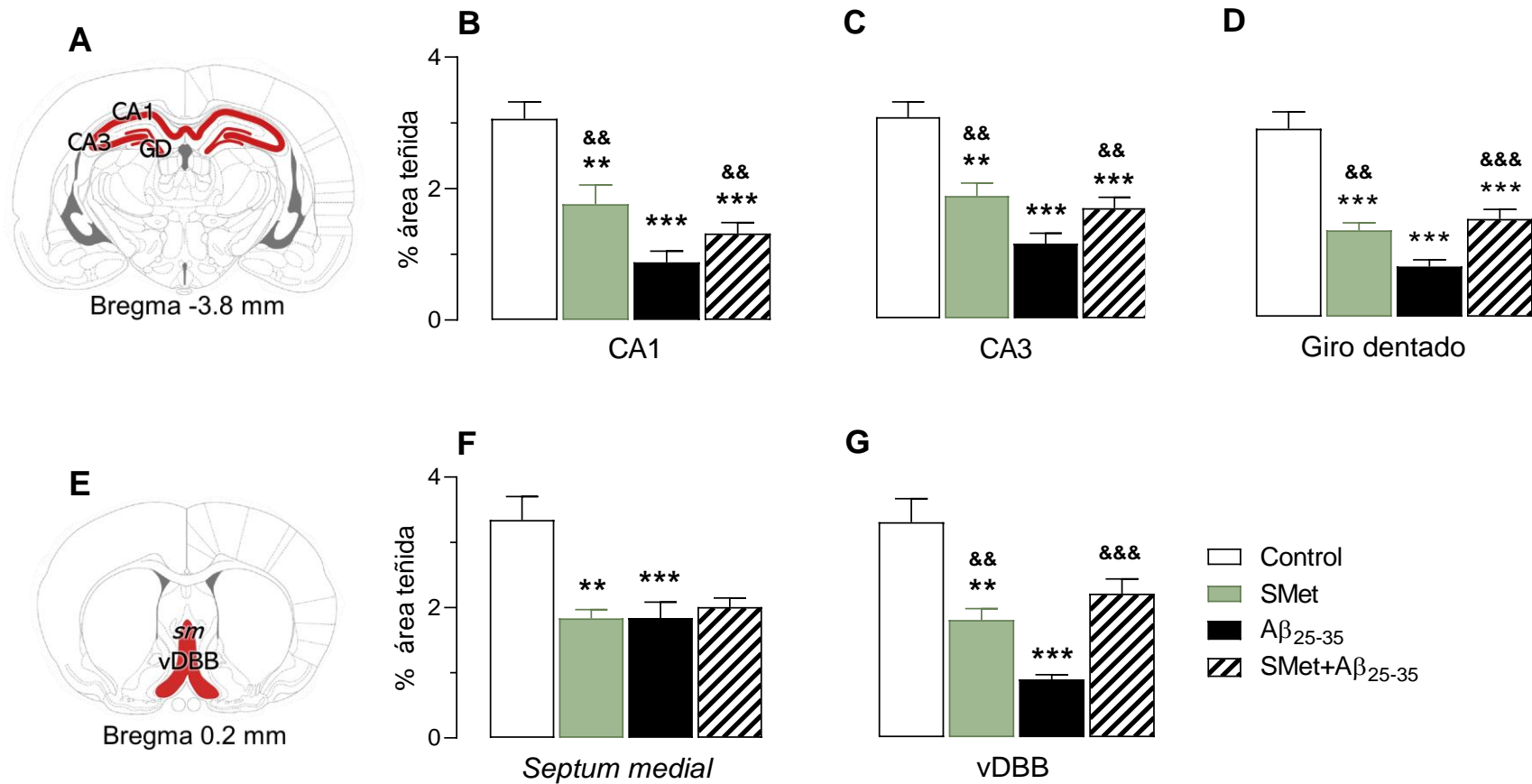


Figura 30. El síndrome metabólico no exagera la pérdida de inmunoreactividad a ChAT en ratas lesionadas con el péptido Aβ₂₅₋₃₅. Los diagramas resaltan las regiones analizadas en **A** el hipocampo y en **E** del *septum medial* y la vDBB (modificado de Paxinos y Watson). Se graficó el porcentaje de área teñida para ChAT en **B** la región CA1 y en **C** la región CA3 del hipocampo, en **D** el GD, en **F** el *septum medial* y en **G** vDBB de los diferentes grupos experimentales ($n=4$, para cada grupo). Se muestra el promedio \pm el EEM, el análisis estadístico se realizó con una prueba Kruskal-Wallis y un post test de Dunn, con valores de ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ respecto al grupo Control y && $p<0.01$, &&& $p<0.001$ respecto al grupo Aβ₂₅₋₃₅.

Otro marcador distintivo de la función colinérgica es la expresión de AChE, debido a su participación en la degradación de acetilcolina.

6.6. El síndrome metabólico más la lesión con el $A\beta_{25-35}$ incrementó la expresión de acetilcolinesterasa en el *septum medial*

Las fotomicrografías de las figuras 31 y 32 son representativas a la ir-AChE de cada grupo experimental. La marca positiva para AChE se detectó en verde (FITC), su disposición fue difusa en el citoplasma y definida en los límites de las neuronas. En el caso particular de la región CA1 del hipocampo la ir-AChE en algunos casos se distinguió en las dendritas basales y en los segmentos distales de las neuronas piramidales (Figura 31 a y g). En la región CA3 del hipocampo, la ir-AChE es menor en el citoplasma neuronal, sin embargo, se delimita la morfología neuronal y en el GD se distinguió área teñida en la capa granular y células positivas en el hilus (Figura 31). En el *septum medial* y la región vDBB la ir-AChE definió neuronas en forma de gota con una marca difusa tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 32 a'-h').

El análisis cuantitativo indicó que la administración del $A\beta_{25-35}$ en la CA1 del hipocampo, provocó un incremento significativo de la ir-AChE en el grupo $A\beta_{25-35}$ (3.1 ± 0.3 , $p < 0.05$) respecto al grupo Control (2.0 ± 0.27), mientras que los tratamientos SMet y SMet+ $A\beta_{25-35}$ evidenciaron una ir-AChE significativamente menor (1.5 ± 0.14 , $p < 0.001$; 2.1 ± 0.17 , $p < 0.01$, respectivamente) comparados con el grupo $A\beta_{25-35}$ (Figura 33 B). En la región CA3 del hipocampo, el análisis estadístico evidenció que el grupo $A\beta_{25-35}$ disminuyó significativamente la ir-AChE (2.4 ± 0.28 , $p < 0.05$) respecto al grupo Control adicionalmente, se encontró una disminución similar del área teñida en los grupos SMet+SSI (2.4 ± 0.15) y SMet+ $A\beta_{25-35}$ (2.5 ± 0.21) comparados con el grupo Control, sin embargo no fueron significativas (Figura 33 C). Respecto al análisis en el *septum medial*, el grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ presentó un incremento significativo (2.6 ± 0.2 , $p < 0.05$) en el área teñida respecto al grupo $A\beta_{25-35}$ (1.9 ± 0.27 , figura 33 F). Por otro lado, no se observaron cambios significativos en el análisis del GD y la región vDBB entre los grupos experimentales (Figura 33 D y G).

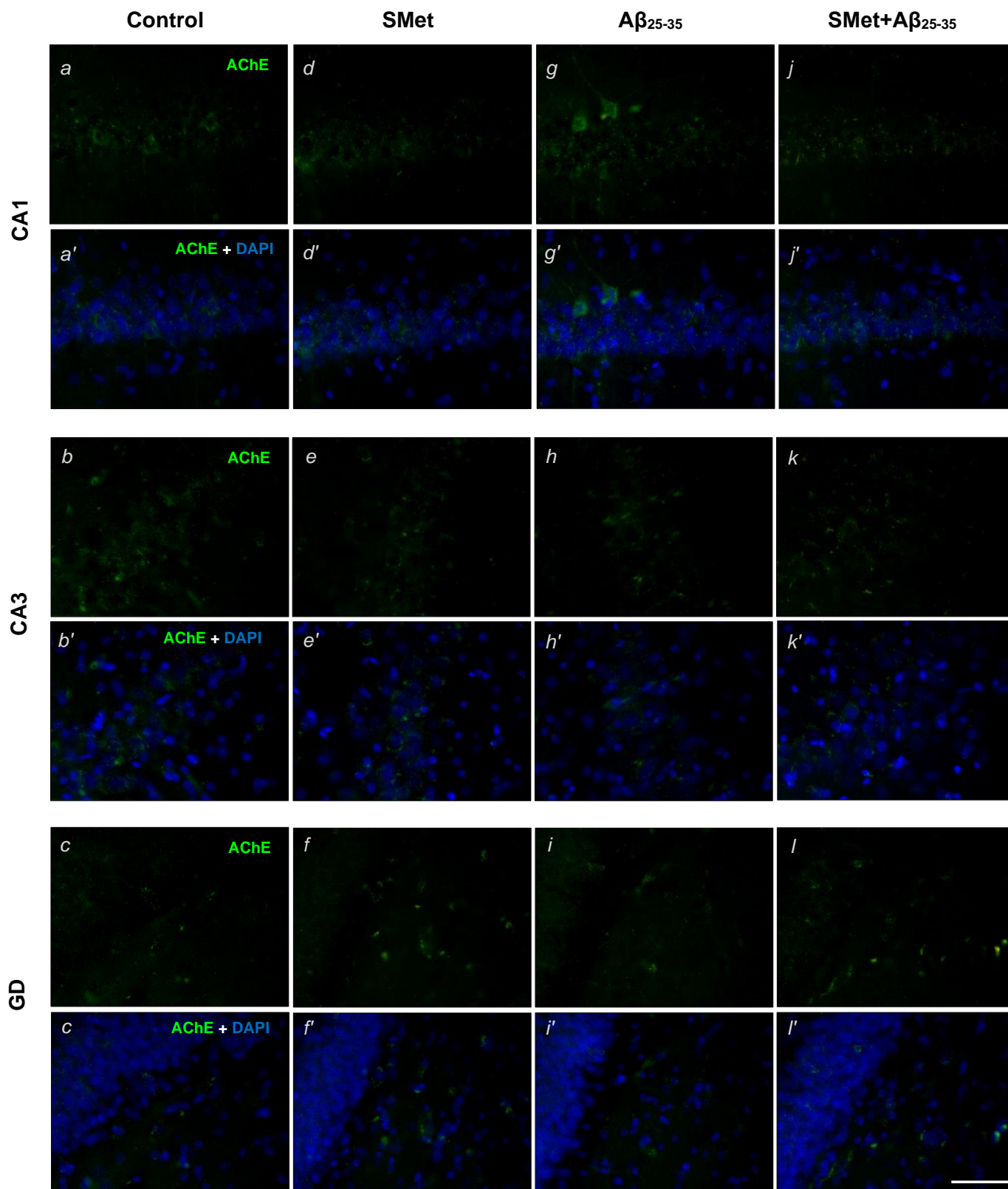


Figura 31. El síndrome metabólico disminuyó la expresión de AChE en la región CA1 del hipocampo de ratas. Se muestran fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad a AChE (verde, a - l) y el empalme con los núcleos (azul, a' - l') en las regiones CA1, CA3 y GD, para cada grupo experimental. Magnificación a 40X. Barra=50 μ m

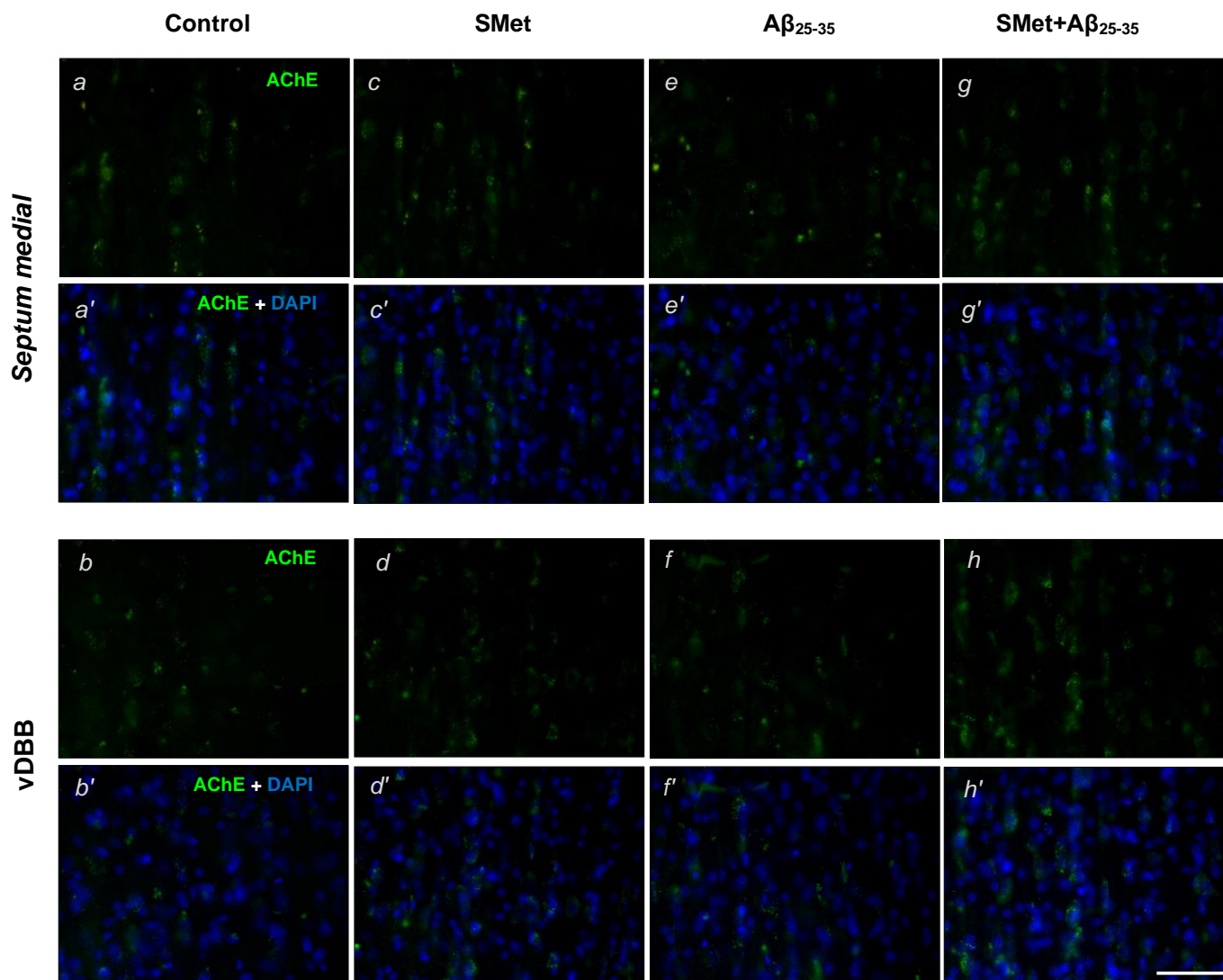


Figura 32. El síndrome metabólico incrementó la expresión de AChE en el *septum medial* de ratas lesionadas con el A β ₂₅₋₃₅. Se muestran fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad a AChE (verde, a - h) y el empalme con los núcleos (azul, a' - h') en el *septum medial* y en la vDBB, para cada grupo experimental. Magnificación a 40X. Barra=50 μ m

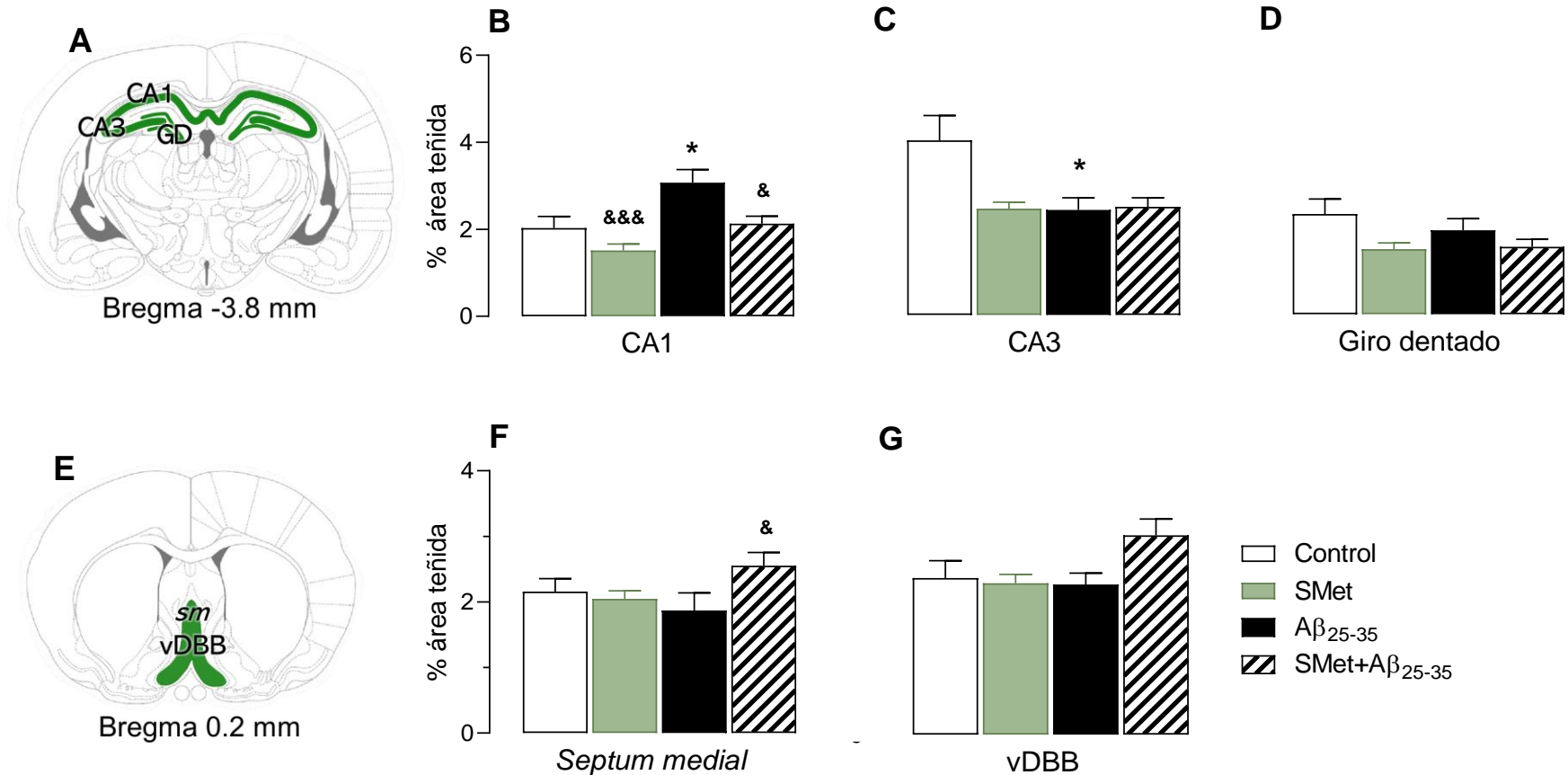


Figura 33. El síndrome metabólico incrementa el área teñida con inmunoreactividad para AChE en el septum medial de ratas lesionadas con el A β_{25-35} . Los diagramas que resaltan las regiones analizadas en **A** del hipocampo y en **E** del septum medial y la vDB (modificado de Paxinos y Watson). Se graficó el porcentaje de área teñida para AChE en **B** la región CA1 y en **C** la región CA3 del hipocampo, en **D** el GD, en **F** el septum medial y en **G** la región vDBB de los diferentes grupos experimentales ($n=3$, para cada grupo). Se muestra el promedio \pm el EEM, el análisis estadístico se realizó con la prueba Kruskal-Wallis, con post-test de Dunn y valores de * $p<0.05$ respecto al grupo Control y & $p<0.05$, && $p<0.001$ respecto al grupo A β_{25-35} .

35.

6.7. El síndrome metabólico más la lesión con A β ₂₅₋₃₅ incrementó la expresión del factor de crecimiento nervioso en la vía septo-hipocampo

Además de explorar la presencia de ChAT y AChE como marcadores de funcionalidad colinérgica, el presente estudio también tuvo como objetivo evaluar la expresión de NGF debido a su papel neutrófico y su participación en el mantenimiento y supervivencia del fenotipo colinérgico en la comunicación septo-hipocampal.

En las figuras 34 y 35 se muestran las fotomicrografías representativas a la ir-NGF y su co-localización con los núcleos para cada región evaluada en los distintos tratamientos. La marca positiva en rojo (Rodamina) se observó prácticamente en todo el citoplasma de las neuronas piramidales en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, así como en la capa granular del GD (Figura 34 a – l). En el *septum medial* y en la región vDBB la ir-NGF permitió distinguir la morfología en forma de gota de las neuronas colinérgicas (Figura 35 a - h).

Los resultados de la cuantificación del área con ir-NGF mostraron que en la región CA1 del hipocampo, el grupo A β ₂₅₋₃₅ disminuyó significativamente (3.1 ± 0.49 , $p < 0.001$) el área teñida respecto al Control, mientras que el grupo SMet presentó un valor de área teñida similar al grupo Control (2.5 ± 2.4 vs. 3.1 ± 0.4 , respectivamente) y el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ mostró un incremento significativo la ir-NGF (5.5 ± 0.644 , $p < 0.05$, $p < 0.001$) en la ir-NGF respecto al grupo Control y A β ₂₅₋₃₅, respectivamente (Figura 36 B). En la región CA3, únicamente el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ evidenció un incremento significativo de área teñida para NGF (6.3 ± 0.55 , $p < 0.001$) comparado con a los demás tratamientos (Control; 3.6 ± 0.42 , SMet; 3.9 ± 0.26 y A β ₂₅₋₃₅; 2.6 ± 0.5) (Figura 36 C). En el GD el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ mostró un porcentaje de ir-NGF significativamente mayor respecto a los grupos Control (3.2 ± 0.43 , $p < 0.001$), SMet (3.9 ± 0.28 , $p < 0.01$) y A β ₂₅₋₃₅ (2.1 ± 0.39 , $p < 0.001$) (Figura 36 D). En cuanto al *septum medial*, se observó la disminución del área teñida en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (6.4 ± 0.55 , $p < 0.001$) y en el grupo SMet (2.5 ± 0.24 , $p < 0.05$), mientras que el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ mostró un valor de ir-NGF similar al grupo Control (6.0 ± 0.6) (Figura 36 F). Finalmente, en la región vDBB, se encontró una disminución significativa de la ir-NGF en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (3.0 ± 0.33 , $p < 0.01$), respecto al grupo Control (6.3 ± 0.89) y el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ evidenció una ir-NGF significativamente mayor (5.7 ± 0.55 , $p < 0.01$) que el grupo A β ₂₅₋₃₅ (3.0 ± 0.33 , 36 G).

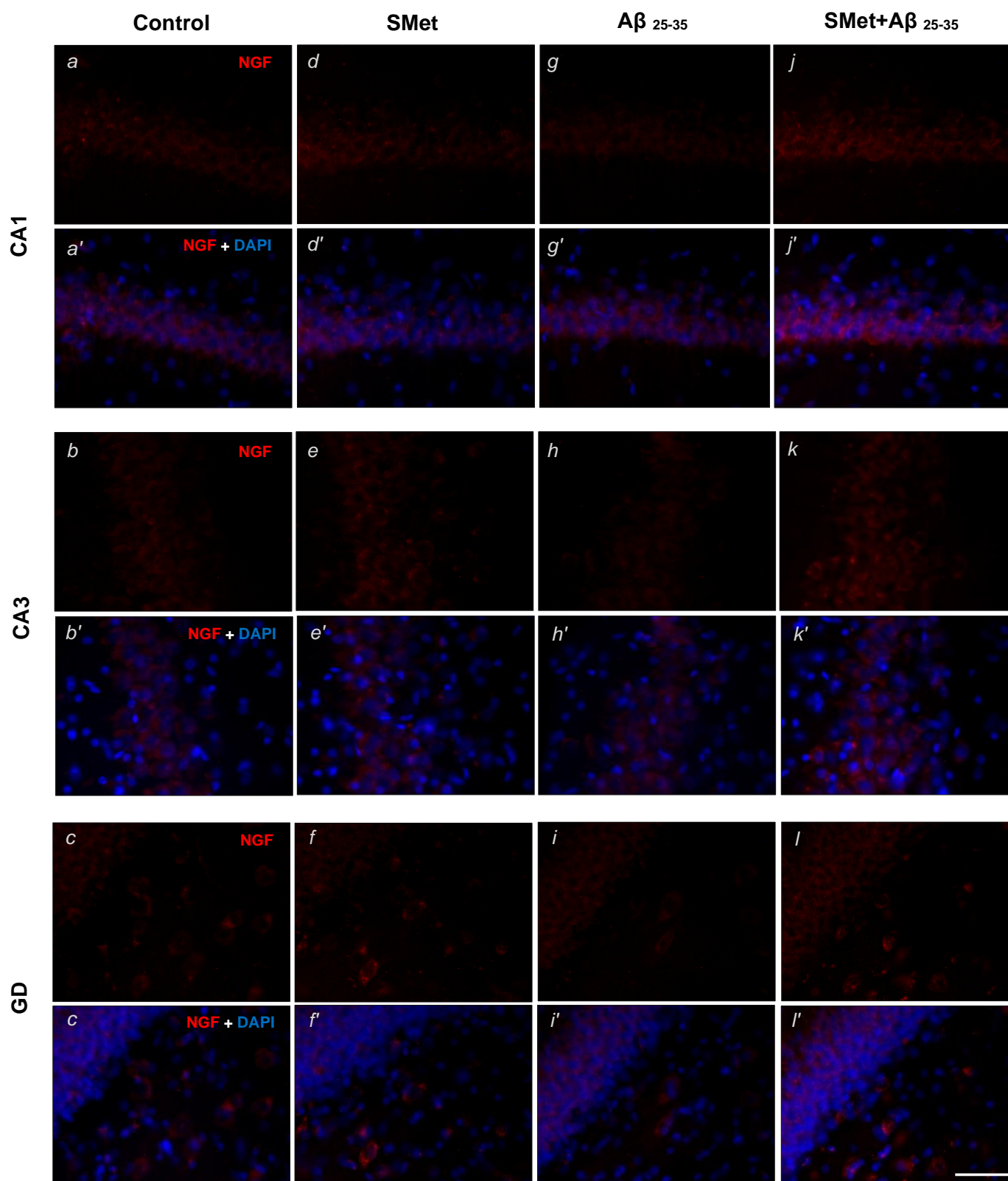


Figura 34. El síndrome metabólico incrementó la expresión de NGF en el hipocampo de ratas lesionadas con el A β ₂₅₋₃₅. Se muestran fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad a NGF (rojo, a - l) y el empalme con los núcleos (azul, a' - l') en las regiones CA1, CA3 y GD para cada grupo experimental. Magnificación a 40X. Barra=50 μ m.

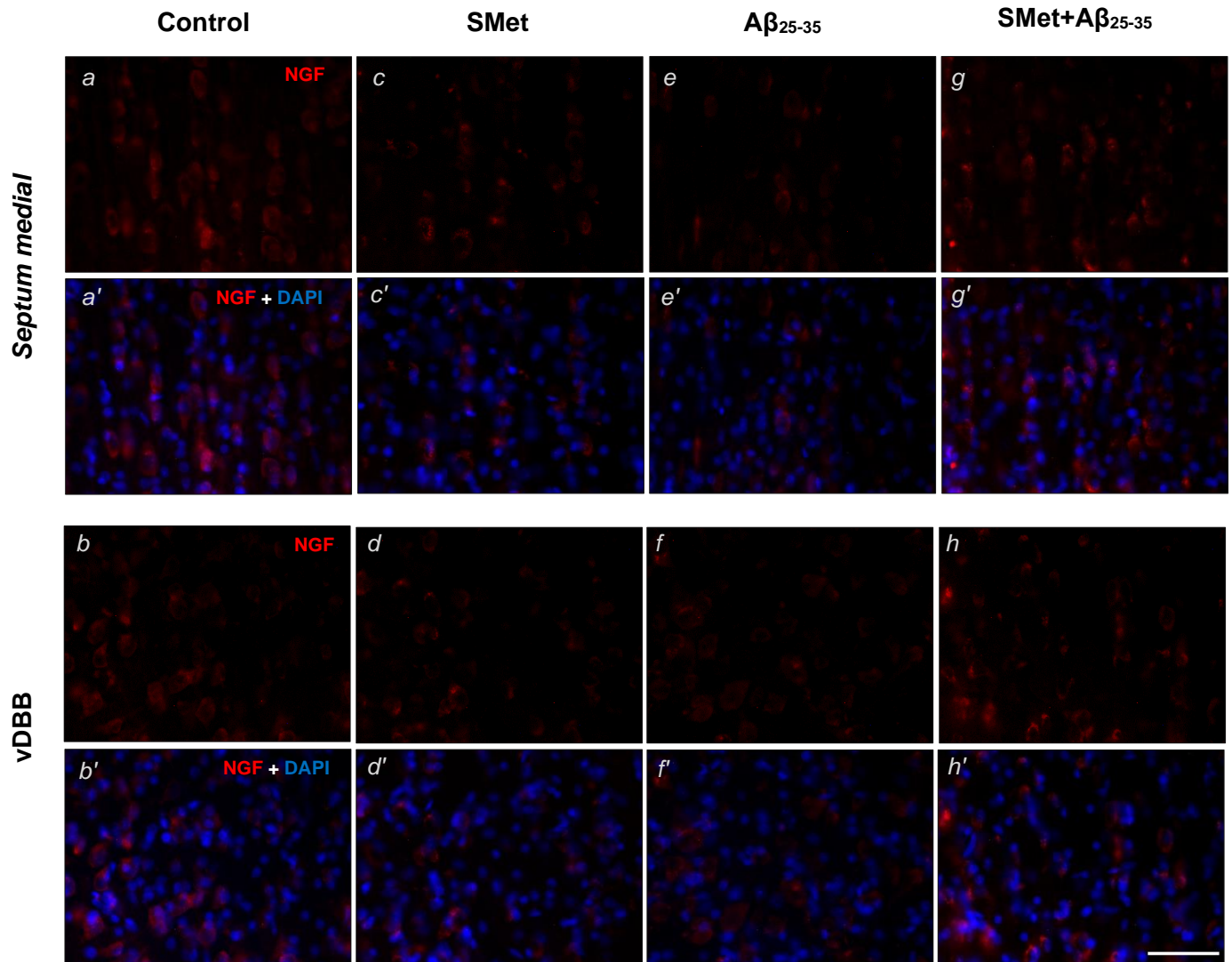


Figura 35. El síndrome metabólico no modificó la expresión de NGF en el *septum medial* de ratas lesionadas con el A β_{25-35} . Se muestran fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad a NGF (rojo, a - h) y el empalme con los núcleos (azul, a' -h') en el *septum medial* y la vDBB para cada grupo experimental. Magnificación a 40X. Barra=50 μ m.

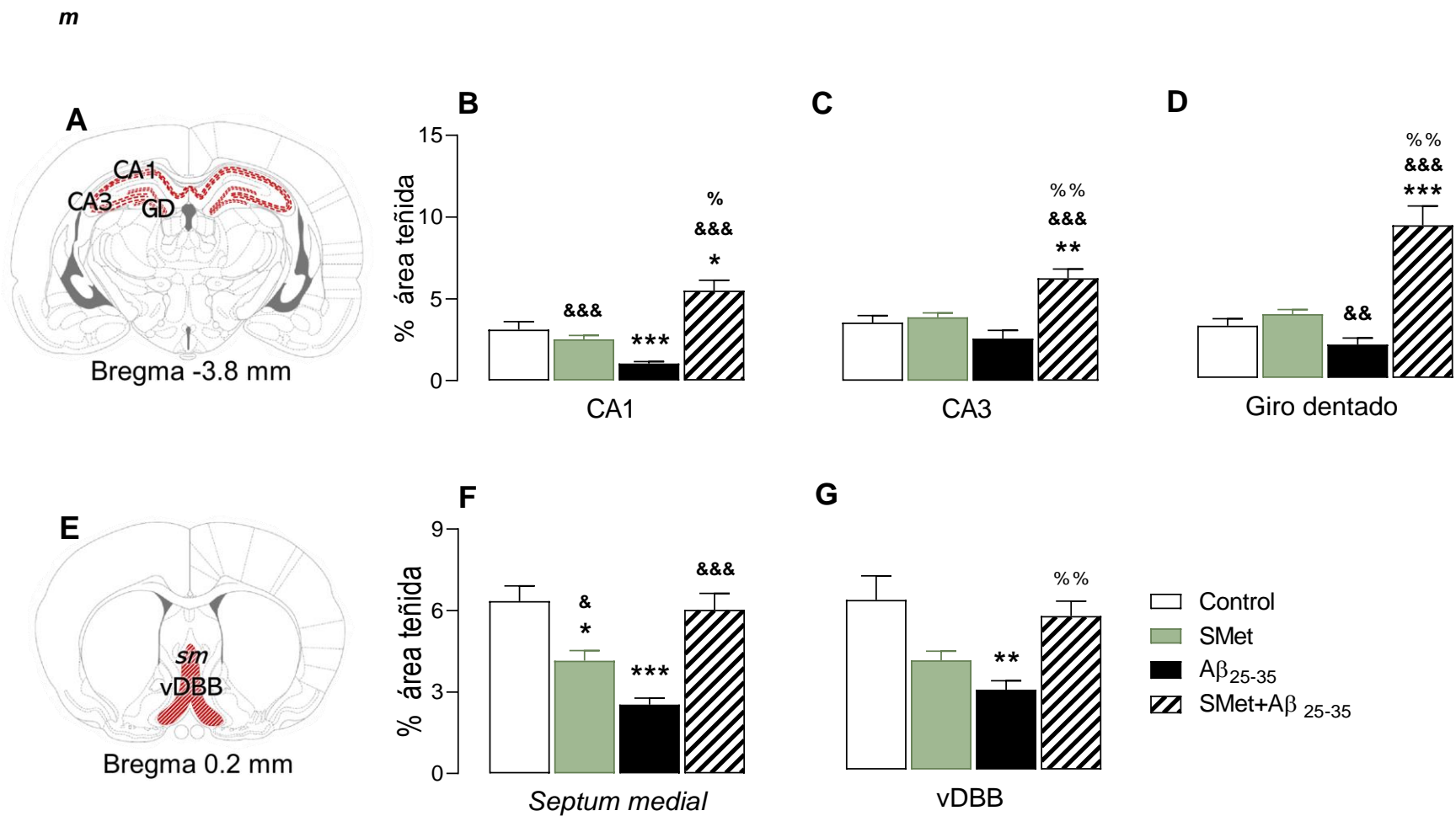


Figura 36. El síndrome metabólico más la lesión con A β_{25-35} incrementan el área teñida para el NGF en regiones de la vía septo-hipocampo. En los diagramas se resaltan las regiones analizadas en **A** del hipocampo y en **E** del *septum medial* y la vDBB (modificado de Paxinos y Watson). Se graficó el porcentaje de área teñida para NGF en **B** la región CA1 y en **C** la región CA3 del hipocampo, en **D** el GD, en **F** el *septum medial* y en **G** la región vDBB de los diferentes grupos experimentales ($n=2$, para cada grupo). Se muestra el promedio \pm el EEM, el análisis estadístico corresponde a una prueba Kruskal-Wallis y post-test de Dunn, con valores de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al grupo Control, & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ respecto al grupo A β_{25-35} y % $p < 0.05$, %% $p < 0.01$, %%% $p < 0.001$ comparado con el grupo SMet.

7. Discusión

El consumo a largo plazo de alimento o soluciones enriquecidas con sacarosa, fructosa o glucosa, producen un incremento en el peso corporal y alteraciones en el perfil metabólico (Cao *et al.*, 2007, Jurdak *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2014, Kanarek y Orthen-Gambill, 1982). El modelo de SMet mostró un incremento significativo del peso corporal, de la circunferencia abdominal y del IMC respecto al grupo Control inicial (Tabla 5), parámetros indicativos de obesidad en las ratas (Figura 14). La acumulación de tejido adiposo en la región abdominal de las ratas del grupo SMet inicial, se debe al desbalance energético que produce el consumo constante de la solución de sacarosa, lo que resulta en la hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo (Figura 4). Por una parte, la glucosa se utilizará como sustrato energético o se almacenará como glucógeno en hígado y músculo, sin embargo, la fructosa al evitar el primer punto de control por la fosfofructocinasa, generará constantemente GA-3P y acetil Co-A que en hepatocitos y adipocitos se utilizaran como precursores de la lipogénesis, estimulando el almacenamiento de lípidos, (Rask-Madsen y Kahn, 2012).

En la obesidad y en el SMet ocurre un desbalance en la liberación de hormonas que median el apetito y la ingesta de alimento, entre ellas la leptina, el glucagón y la adiponectina. En principio la liberación de insulina y adiponectina incrementan y modulan el metabolismo de glucosa y lípidos, promoviendo la acumulación de los FFA. Además, la constante estimulación de la liberación de insulina y su función anabólica, promueve la desensibilización del receptor sobre los adipocitos, los hepatocitos y en el tejido músculo esquelético, por lo que al administrar una carga de glucosa en los animales del grupo SMet se observó la falla en la incorporación de la glucosa, probablemente debido a la resistencia a la insulina y por el incremento de triglicéridos, consecuencia de la hiperinsulinemia (Kanarek y Orthen-Gambill, 1982). Con lo anterior, se muestra que la cantidad de calorías que consumen los animales y el tiempo de exposición a la dieta, son componentes definitivos en el desarrollo de SMet en los animales experimentales y que en el presente proyecto reunió los parámetros de 1) obesidad, 2) intolerancia a la glucosa, 3) incremento en la concentración de insulina, 4) incremento en los niveles de glucosa y 5) incremento en los niveles de triglicéridos (Tabla 5 y Figura 23)

Los reportes experimentales que relacionan al SMet con la función cognitiva en un modelo para el estudio de la EA son escasos. Por ello, en el modelo de SMet con la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ se evaluó el aprendizaje y la memoria espacial. El hipocampo es una región que participa en tareas espaciales como la navegación y se ha observado que es particularmente vulnerable a los efectos negativos de las dietas con elevado contenido en azúcar (Hsu *et al.*, 2015). La evaluación del aprendizaje en el LAM mostró que los grupos SMet y SMet+A β ₂₅₋₃₅, no presentaron déficit en el aprendizaje comparados con el grupo Control, cuando se analizaron las latencias de

escape (Figura 24). Lo anterior se debe en parte a que el protocolo conductual consiste en ensayos múltiples y la repetición de la tarea estimula el aprendizaje motor además del espacial, demostrando la participación de otras regiones cerebrales como el estriado que podrían no encontrarse dañadas frente al consumo de sacarosa (Sharpe *et al.*, 2016). A nivel celular, el nado es capaz de fosforilar la sinapsina y a CREB en ratas que consumen una dieta alta en grasas (Molteni *et al.*, 2004), mecanismos necesarios para el flujo de la información durante la adquisición de la tarea espacial.

En la evaluación de la memoria espacial, el grupo SMet+A β_{25-35} únicamente mostró cambios significativos en el número de cruces a la zona de la plataforma, indicativo de la interrupción en la recuperación de la información que adquirió durante el aprendizaje. Este hecho se debe probablemente por la pérdida en la plasticidad neuronal que ocurre en el solo modelo que consume la HSD (Molteni *et al.*, 2002) a lo que se suman los mecanismos de EO, neuroinflamación, apoptosis y pérdida de fenotipo colinérgico descritas en el modelo de A β_{25-35} (Limón *et al.*, 2009, Díaz *et al.*, 2011, Patricio-Martínez *et al.*, 2016). Si bien múltiples reportes muestran que el consumo de dietas promueve el déficit en el aprendizaje y la memoria, los resultados varían de acuerdo con la composición de las dietas hipercalóricas, el tiempo de exposición incluso la cepa y edad de los roedores, además del paradigma que se seleccione para realizar la prueba (Cordner y Tamashiro, 2015). En el análisis detallado de los mapas de calor, se observó que los grupos SMet, A β_{25-35} permanecieron la mayor parte del tiempo navegando en el cuadrante contrario a donde se localizaba la plataforma de escape, en una región muy cercana a la señal intralaberíntica contraria. Respecto al grupo SMet+A β_{25-35} aunque mantuvo una búsqueda en el cuadrante blanco, no tuvo éxito para recordar el sitio exacto donde se localizaba la plataforma (Figura 26).

Si bien, los resultados conductuales son variables, se propone que los mecanismos que relacionan al SMet con el déficit cognitivo son el ambiente oxidativo y de inflamación persistente, la oxidación de los lípidos de membrana, especialmente del endotelio importante en la disrupción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que conduce a la difusión de moléculas oxidadas, citocinas proinflamatorias y el transporte desregulado de hormonas (leptina, insulina, grelina) para la regulación metabólica en el hipotálamo (Guillemont-Legrís y Muccioli, 2017). Además, en modelos experimentales con alteraciones metabólicas se ha observado que la respuesta a la insulina en el cerebro también se compromete, conduciendo a una disminución en vías de señalización de supervivencia neuronal activadas por neurotrofinas, que promueve a la plasticidad neuronal (Molteni *et al.*, 2002, Beilharz *et al.*, 2014) y con ello al mantenimiento de la integridad y comunicación en los circuitos que modulan el aprendizaje y la memoria espacial, lo que da evidencia la vulnerabilidad de los sustratos cognitivos frente a las alteraciones metabólicas.

Considerando que en la EA la pérdida de memoria es una de las manifestaciones clínicas con mayor prominencia y que la disfunción colinérgica tiene un papel importante durante este proceso cognitivo, en el presente trabajo estudiamos la implicación del SMet en un modelo experimental de EA sobre la presencia de la enzima de síntesis y degradación de acetilcolina en la vía septo-hipocampo. Los resultados indican que el tratamiento en el grupo SMet disminuye la expresión de ChAT en las regiones evaluadas del hipocampo en el *septum medial* y la vDBB, similar al grupo A β_{25-35} (Figura 30). Se reconoce que las características del SMet a nivel periférico producen un ambiente de pro-oxidante y proinflamatorio que inicia en el hipotálamo y en periodos largos se distribuye a regiones cerebrales cuya tasa energética es alta, como sucede con el hipocampo a través de la utilización de la glucosa (Kanoski *et al.*, 2011) y en el *septum medial* por su dependencia de acetil-CoA a partir de glucosa para la síntesis de ACh. Estos hallazgos y su comparación son importantes porque demuestran que el SMet, producto del consumo de sacarosa por seis meses, tiene la capacidad de modificar la expresión de ChAT, a través de mecanismos similares a los producidos por los oligómeros del A β_{25-35} . En el grupo SMet+A β_{25-35} no se observó un incremento en la neurotoxicidad inducida por el A β_{25-35} , debido en parte a los mecanismos que contrarrestan el daño, como las defensas antioxidantes o mediación de la supervivencia neuronal y el proceso de neuroinflamación a través de factores tróficos (Molteni *et al.*, 2002; Ullrich *et al.*, 2010).

Además, es importante considerar el papel de la resistencia a la insulina en el SMet. Se ha reportado que la resistencia a la insulina en hipocampo reduce la densidad de espinas dendríticas y los niveles del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) (Calvo-Ochoa *et al.*, 2014, Stranahan *et al.*, 2008) mientras que en neuronas del *septum medial* provenientes del ratón 3Tg-AD, la resistencia a la insulina disminuye la expresión de ChAT (Sposato *et al.*, 2018), la cual se recupera con el tratamiento con NGF, efecto mediado por la activación de p-IRS1-Akt, y coincide con nuestros resultados en los que la reducción en el área teñida para la ir-ChAT estaría asociada con la reducción del área con ir-NGF en la CA1 del hipocampo y en menor cantidad en *septum medial* (Figura 36 B y 36 E), debido a la reducción de neurotrofina que se transporta retrógradamente al soma de la neurona colinérgica (Niewiadomska *et al.*, 2012).

El efecto anterior podría sustentarse por un mecanismo mediado por astrocitos reactivos, que en respuesta a la presencia de A β_{25-35} son capaces de inducir la expresión de NGF mediante la activación del receptor TrkA y la vía PI3K-Akt en el hipocampo y mediar la sobrevivencia neuronal (Sáez *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesario realizar la evaluación de la reactividad a astrocitos en el modelo experimental que se desarrolló en el presente trabajo, para reforzar nuestra hipótesis. Para relacionar la respuesta ChAT-NGF, en el grupo SMet con administración del A β_{25-35} , puede

deberse a que la forma oligomérica de A β es capaz de inducir la fosforilación de tau, lo que desestabilizaría el andamio necesario en el transporte de NGF hacia el soma colinérgico, evidenciando una ligera disminución del área teñida con ir-NGF en el *septum medial* y la vDBB del grupo SMet+A β_{25-35} comparado con el grupo Control (Figura 36 F y 36 G) e interesantemente, la respuesta en este grupo experimental tiende a incrementar, comparado con el grupo SMet, en donde podríamos sugerir que NGF estaría ejerciendo un efecto de mantenimiento al mostrar un valor similar de área teñida a ChAT en *septum medial* y vDBB (Figura 30 F y 30G).

La participación de AChE en la comunicación colinérgica es un mecanismo importante en la modulación de los niveles de acetilcolina. Los resultados indican que en la región CA1 del hipocampo del grupo A β_{25-35} , el área teñida con ir-AChE incrementa, similar a reportes previos en los que el incremento en la expresión de AChE correlaciona con los sitios donde comienzan a desencadenarse la neuroinflamación y comienza a acumularse el A β (Li *et al.*, 2000, García-Ayllón *et al.*, 2008). Por otro lado, no se observaron cambios en la expresión de AChE en los grupos SMet y SMet+A β_{25-35} , probablemente se deba a un mecanismo de regulación en el que niveles reducidos de AChE permitirán mantener niveles óptimos de acetilcolina (Kaizer *et al.*, 2004, Kosari *et al.*, 2012).

Finalmente, estos hallazgos indican que el SMet+A β_{25-35} no interfiere durante el aprendizaje, ni exagera el daño en la memoria además no modifica la expresión de ChAT, ni de AChE, pero si incrementa la expresión de NGF en la vía septo-hipocampo. Sin embargo, el presente proyecto proporciona información valiosa sobre la participación y vulnerabilidad del sistema colinérgico en el modelo de SMet.

8. Conclusiones

1. El síndrome metabólico más la lesión con el péptido amiloide β_{25-35} en la región CA1 del hipocampo no modifican el aprendizaje y la memoria espacial de ratas evaluadas en el laberinto acuático de Morris.
2. El síndrome metabólico más la lesión con el péptido amiloide β_{25-35} en la región CA1 del hipocampo no incrementan la pérdida de colina acetiltransferasa en el hipocampo y en el *septum medial* de ratas.
3. El síndrome metabólico más la lesión con el péptido amiloide β_{25-35} en la región CA1 del hipocampo disminuyen la inmunoreactividad de acetilcolinesterasa en el sitio de lesión e incrementa en el *septum medial* de ratas.
4. El síndrome metabólico más la lesión con el péptido amiloide β_{25-35} en la región CA1 del hipocampo incrementan la inmunoreactividad al factor de crecimiento nervioso en el hipocampo y *septum medial* de ratas.

9. Perspectivas

1. Analizar los niveles del factor de crecimiento nervioso mediante ELISA en el hipocampo y el *septum medial* en el modelo de síndrome metabólico lesionado en la región CA1 del hipocampo con el péptido amiloide β_{25-35} .
2. Analizar la participación de astrocitos, mediante la evaluación histológica de GFAP en el hipocampo y el *septum medial* en el modelo de síndrome metabólico lesionado en la región CA1 del hipocampo con el péptido amiloide β_{25-35} .
3. Evaluar la actividad de la colina acetiltransferasa y de la acetilcolinesterasa en la formación hipocampal y el *septum medial* en el modelo de síndrome metabólico lesionado en la región CA1 del hipocampo con el péptido amiloide β_{25-35} .
4. Explorar la susceptibilidad al daño de la memoria de trabajo o el reconocimiento de objetos novedosos en el modelo de síndrome metabólico lesionado en la región CA1 del hipocampo con el péptido amiloide β_{25-35} .

10. Referencias

A

Ae Park, S., Choi, M. S., Cho, S. Y., Seo, J. S., Jung, U. J., Kim, M. J., Sung, M. K., Park, Y. B., & Lee, M. K. (2006). Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life sciences*, 79(12), 1207–1213.

Aguilera, A.A., Diaz, G.H., Barcelata, M.L., Guerrero, O.A., & Ros R.M. (2004). Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(6), 350–357.

Alexander, C.M., Landsman, P.B., Teutsch, S.M., & Haffner, S.M. (2003). NCEP-Defined Metabolic Syndrome, Diabetes and prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES Participants Age 50 Years and Older. *Diabetes*, 52(5), 1210-1214.

Alzheimer's Association (2016). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 12(4), 459–509.

Arias-Mutis, Ó. J., Genovés, P., Calvo, C. J., Díaz, A., Parra, G., Such-Miquel, L., Such, L., Alberola, A., Chorro, F. J., & Zarzoso, M. (2018). An Experimental Model of Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rabbit: Methodological Considerations, Development, and Assessment. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (134), 57117.

B

Baldwin, W., McRae, S., Marek, G., Wymer, D., Pannu, V., Baylis, C., Johnson, R. J., & Sautin, Y. Y. (2011). Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 60(4), 1258–1269.

Barrios-Ramos, J., Garduño-Siciliano, L., Loredó-Mendoza, M., Chamorro-Cevallos, G., Jaramillo-Flores, M. E., Madrigal-Bujaidar, E. & Álvarez-González, I. (2014). A quick model for the induction of metabolic syndrome markers in rats. *Internal Medicine*, 4(1), 1-5.

Bartus, R. T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental neurology*, 163(2), 495–529.

Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, behavior, and immunity*, 37, 134–141.

Bizeau, M. E., & Pagliassotti, M. J. (2005). Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism: clinical and experimental*, 54(9), 1189–1201.

Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 79(4), 537–543.

Bruce, G., & Hersh, L. B. (1989). The phosphorylation of choline acetyltransferase. *Neurochemical research*, 14(7), 613–620.

C

Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., & Arias, C. (2014). Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the international society of cerebral blood flow and metabolism*, 34(6), 1001–1008.

Cao, D., Lu, H., Lewis, T. L., & Li, L. (2007). Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 282(50), 36275–36282.

- Chen, G. C., Huang, C. Y., Chang, M. Y., Chen, C. H., Chen, S. W., Huang, C. J., & Chao, P. M. (2011) Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism: clinical and experimental*, 60(2), 155–164.
- Chew, G.T., Gan, S.K., & Watts, G.F. (2008). Revisiting the metabolic syndrome. *The medical journal of Australia*, 185(8), 445-449.
- Cordain, L., Eaton, S. B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. A., O'Keefe, J. H., & Brand-Miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American journal of clinical nutrition*, 81(2), 341–354.
- Cordner, Z. A., & Tamashiro, K. L. (2015). Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiology & behavior*, 152(Pt B), 363–371.
- Cornier, M.A., Dabelea, D., Hernandez, T.L., Lindstrom, R.C., Steig A.J., Stob A.J., Van Pelt R.E., Wang H., & Eckel, R.H. (2008). The Metabolic Syndrome. *Endocrine reviews*, 29(7): 777–822.
- D**
- Damasceno, D. C., Netto, A. O., Iessi, I. L., Gallego, F. Q., Corvino, S. B., Dallaqua, B., Sinzato, Y. K., Bueno, A., Calderon, I. M., & Rudge, M. V. (2014). Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed research international*, 819065.
- Davidson, E. P., Coppey, L. J., Dake, B., & Yorek, M. A. (2011). Effect of Treatment of Sprague Dawley Rats with AVE7688, Enalapril, or Candoxatril on Diet-Induced Obesity. *Journal of obesity*, 686952.
- de-Diego, I., Moreno-Sanz, A., Müller-Eigner, A., Ventkatasubrami, A.V., Langhammer, M., Gerlini R., Rathkolb B., Aguilar-Pimentel, A., Klein-Rodewald, T., Calzada-Wack, J., Becker, L., Imhof, A., Meng, C., Ludwing, C., Koch, F., von Krusenstiern E., Varner E., Snyder N.W., Caton, V., Brenmoehl, J., Hoeflich, A., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hrabe de Angelis, M. & Peleg, S.(2020) Titan Mice are Unique Short-Lived mammalian model of metabolic syndrome and aging. *bioRxiv*. In press.
- Dhingra, R., Sullivan, L., Jacques, P. F., Wang, T. J., Fox, C. S., Meigs, J. B., D'Agostino, R. B., Gaziano, J. M., & Vasan, R. S. (2007). Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation*, 116(5), 480–488.
- Deeb, S. S., Fajas, L., Nemoto, M., Pihlajamäki, J., Mykkänen, L., Kuusisto, J., Laakso, M., Fujimoto, W., & Auwerx, J. (1998). A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature genetics*, 20(3), 284–287.
- Diaz, A., Limón, D., Chávez, R., Zenteno, E., & Guevara, J. (2012). Aβ25-35 injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *Journal of Alzheimer's disease*, 30(3), 505–522.
- Dickhout, J. G., & Lee, R. M. (1998). Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *The American journal of physiology*, 274(3), H794–H800.
- Dissard, R., Klein, J., Caubet, C., Breuil, B., Siwy, J., Hoffman, J., Sicard, L., Ducassé, L., Rascalou, S., Payre, B., Buléon, M., Mullen, W., Mischak, H., Tack, I., Bascands, J. L., Buffin-Meyer, B., & Schanstra, J. P. (2013). Long term metabolic syndrome induced by a high fat high fructose diet leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice. *PloS one*, 8(10), e76703.
- Dobrian, A. D., Davies, M. J., Prewitt, R. L., & Lauterio, T. J. (2000). Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*, 35(4), 1009–1015.
- Dong, Y. F., Liu, L., Kataoka, K., Nakamura, T., Fukuda, M., Tokutomi, Y., Nako, H., Ogawa, H., & Kim-Mitsuyama, S. (2010). Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 53(1), 180–191.

Dubuc, P.U. (1976). The development of obesity, hyperinsulinemia and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism*, 25, 1567–1574.

E

Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468), 1415–1428.

F

Farr, S., Yamada, K., Butterfield, D., Abdul, H., Xu, L., Miller, N., Banks, W.A., & Morley, J. (2008) Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology*, 149, 2628-2636.

Fernández-Ruiz A., & Oliva A. (2016). Distributed representation of “what” and “where” information in the parahippocampal region. *Journal of neuroscience*, 36(32) 8286–8288.

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*, 14(1), 101–115.

Fisher S.K., & Wonnacott, A. (2012) Acetylcholine. Basis neurochemistry; principles of molecular, cellular and medical neurobiology. 13; 259-280.

Ford, E.S. (2005) Prevalence of the Metabolic syndrome Defined by the International Diabetes Federation Among Adults in the U.S. *Diabetes Care*, 28(11) 2745-2749.

Fransson, L., Franzén, S., Rosengren, V., Wolbert, P., Sjöholm, Å., & Ortsäter, H. (2013). β -Cell adaptation in a mouse model of glucocorticoid-induced metabolic syndrome. *The Journal of endocrinology*, 219(3), 231–241.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 114(12), 1752–1761.

G

Gallou-Kabani, C., Vigé, A., Gross, M. S., Rabès, J. P., Boileau, C., Larue-Achagiotis, C., Tomé, D., Jais, J. P., & Junien, C. (2007). C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity*, 15(8), 1996–2005.

García-Ayllón, M. S., Silveyra, M. X., & Sáez-Valero, J. (2008). Association between acetylcholinesterase and beta-amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), 209–215.

GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A., Forouzanfar M.H., Reitsma M.B., Sur P., Estep K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A. H., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., Salama, J. S., Vos, T., Abate, K. H., Abbafati, C., Ahmed, M. B., Al-Aly, Z., Alkerwi, A., Al-Raddadi, R., Amare, A. T., ... Murray, C. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *The New England journal of medicine*, 377(1), 13–27.

Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., van Heek, M., & Hwa, J. J. (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity research*, 10(9), 956–963.

Goto, Y., Kakizaki, M., & Masaki, N. (1976). Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 119(1), 85–90.

Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature reviews. *Molecular cell biology*, 9(5), 367–377.

Guillemot-Legris, O., & Muccioli, G. G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends in neurosciences*, 40(4), 237–253.

Gomez-Smith, M., Karthikeyan, S., Jeffers, M. S., Janik, R., Thomason, L. A., Stefanovic, B., & Corbett, D. (2016). A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiology & behavior*, 167, 382–391.

Greenwood, C. E., & Winocur, G. (1996). Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: a specific effect of saturated fatty-acid intake. *Behavioral neuroscience*, 110(3), 451–459.

Grundy S. M. (2008). Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(4), 629–636.

Gu, Z., & Yakel, J. L. (2011). Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 71(1), 155–165.

Gurnell M. (2003). PPARgamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants. *Clinical endocrinology*, 59(3), 267–277.

Gustaw-Rothenberg, K., Lerner, A., Bonda, D. J., Lee, H. G., Zhu, X., Perry, G., & Smith, M. A. (2010). Biomarkers in Alzheimer's disease: past, present and future. *Biomarkers in medicine*, 4(1), 15–26.

H

Hagan J. J., Jansen J. H., & Broekkamp C. L. (1987). Blockade of spatial learning by the M1 muscarinic antagonist pirenzepine. *Psychopharmacology*, 93, 470–476.

Hagan J. J., Salamone J. D., Simpson J., Iversen S. D., & Morris R. G. (1988). Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behavioral Brain Research*, 27, 9–20.

Hao, L., Lu, X., Sun, M., Li, K., Shen, L., & Wu, T. (2015). Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Food & nutrition research*, 59, 28886.

Hattori, T., Murase, T., Ohtake, M., Inoue, T., Tsukamoto, H., Takatsu, M., Kato, Y., Hashimoto, K., Murohara, T., & Nagata, K. (2011). Characterization of a new animal model of metabolic syndrome: the DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rat. *Nutrition & diabetes*, 1(1), e1.

Hu, F. B., & Malik, V. S. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiology & behavior*, 100(1), 47–54.

Hsu, T. M., Konanur, V. R., Taing, L., Usui, R., Kayser, B. D., Goran, M. I., & Kanoski, S. E. (2015). Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. *Hippocampus*, 25(2), 227–239.

J

Janja M. (2007) Genetic susceptibility to metabolic syndrome. *The journal of the international federation of clinical chemistry and laboratory medicine*, 18(1) 7-14.

Jurdak, N., Lichtenstein, A. H., & Kanarek, R. B. (2008). Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. *Nutritional neuroscience*, 11(2), 48–54.

K

Kaizer, R.R., da Silva, A.C., Morsch, V.M., Corrêa, M.C. & Schetinger, M.R. (2004) Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure. *Neurochemical Research*, 29(12), 2251-2255.

Kanarek, R. B., & Orthen-Gambill, N. (1982). Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *The Journal of nutrition*, 112(8), 1546–1554.

- Kanoski, S. E., & Davidson, T. L. (2010). Different patterns of memory impairments accompany short- and longer-term maintenance on a high-energy diet. *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes*, 36(2), 313–319.
- Kanoski, S. E., Zhang, Y., Zheng, W., & Davidson, T. L. (2010). The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *Journal of Alzheimer's disease*, 21(1), 207–219.
- Kawasaki, T., Kashiwabara, A., Sakai, T., Igarashi, K., Ogata, N., Watanabe, H., Ichianagi, K., & Yamanouchi, T. (2005). Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. *The British journal of nutrition*, 93(5), 613–618.
- King B. M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiology & behavior*, 87(2), 221–244.
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S.M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S.C., Tschöp, M.H.,... (2018) Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature review endocrinology*, 14:140–162.
- Koop W. (2019). How Western Diet and Lifestyle Drive Pandemic of Obesity and Civilization Diseases. *Diabetes metabolic syndrome and obesity*, 12, 2221-2236.
- Kosari, S., Badoer, E., Nguyen, J. C., Killcross, A. S., & Jenkins, T. A. (2012). Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behavioral brain research*, 235(1), 98–103.
- Kravitz, A. V., O'Neal, T. J., & Friend, D. M. (2016). Do Dopaminergic Impairments Underlie Physical Inactivity in People with Obesity? *Frontiers in human neuroscience*, 10, 514.
- Kubo, T., Nishimura, S., Kumagae, J., & Kaneko, I. (2002) In vivo conversion of racemized-amyloid ([D-Ser26]A1–40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser26]A25–35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *Journal of Neuroscience Research*, 70, 474–483.
- L**
- Larqué, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Gutiérrez-Reyes, G., Moreno, J., Robles-Díaz, G., Hong, E., & Hiriart, M. (2011). Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB life*, 63(10), 831–839.
- Lavenex P., & Amaral D. G. (2000). Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity. *Hippocampus*, 10, 420–430.
- Lecoultre, V., & Tappy, L. (2013). Fructose, sugar consumption, and metabolic disease. *Metabolic Syndrome and Neurological Disorders*, 13, 501-513.
- Lehnen, A. M., Rodrigues, B., Irigoyen, M. C., De Angelis, K., & Schaan, B. D. (2013). Cardiovascular changes in animal models of metabolic syndrome. *Journal of diabetes research*, 761314.
- Leonard, B. L., Watson, R. N., Loomes, K. M., Phillips, A. R., & Cooper, G. J. (2005). Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterization of obese and lean phenotypes. *Acta diabetologica*, 42(4), 162–170.
- Leslie B. R. (2005). Metabolic Syndrome: Historical Perspectives. *The American Journal of Medical Sciences*, 330 (6): 264-268.
- Lenzen, S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51, 216–226
- Li, Y., Liu, L., Kang, J., Sheng, J. G., Barger, S. W., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2000). Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(1), 149–155.

Limón, D., Díaz, A., Hernandez, M., Fernandez-G, J. M., Torres-Martínez, A. C., Pérez-Severiano, F., Rendón-Huerta, E. P., Montaña, L. F., & Guevara, J. (2012). Neuroprotective effect of the aminoestrogen prolame against impairment of learning and memory skills in rats injected with amyloid- β -25-35 into the hippocampus. *European journal of pharmacology*, 685(1-3), 74–80.

Limón, I. D., Díaz, A., Mendieta, L., Chamorro, G., Espinosa, B., Zenteno, E., & Guevara, J. (2009). Amyloid-beta(25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neuroscience research*, 63(2), 129–137.

Liu, R., McAllister, C., Lyubchenko, Y., & Sierks, M. R. (2004). Residues 17-20 and 30-35 of beta-amyloid play critical roles in aggregation. *Journal of neuroscience research*, 75(2), 162–171.

Lusting, R.H. & Gugliucci A. (2020). Metabolic syndrome signaling. [Poster]. Recuperado de <https://www.biotechne.com/resources/literature/metabolic-syndrome-signaling#:~:text=Metabolic%20syndrome%20is%20an%20increasingly,non%20alcoholic%20fatty%20liver%20disease.>

M

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature medicine*, 8(7), 731–737.

Mahmoud, A. A., & Elshazly, S. M. (2014). Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PloS one*, 9(9), e106993.

Mamikutty, N., Thent, Z. C., Sapri, S. R., Sahrudin, N. N., Mohd Yusof, M. R., & Haji Suhaimi, F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed research international*, 263897.

Mansour, S.M., Zaki, H.F. & Ezz-El-Din, S. (2013). Beneficial effects of co-enzyme Q 10 and rosiglitazone in fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Bulletin of faculty of pharmacy, Cairo university*, 51 (1):13–21.

Malik, V. S., & Hu, F. B. (2015). Fructose and Cardiometabolic Health: What the Evidence From Sugar-Sweetened Beverages Tells Us. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(14), 1615–1624.

Martino Adami, P. V., Galeano, P., Wallinger, M. L., Quijano, C., Rabossi, A., Pagano, E. S., Olivar, N., Reyes Toso, C., Cardinali, D., Brusco, L. I., Do Carmo, S., Radi, R., Gevorkian, G., Castaño, E. M., Cuello, A. C., & Morelli, L. (2017). Worsening of memory deficit induced by energy-dense diet in a rat model of early-Alzheimer's disease is associated to neurotoxic A β species and independent of neuroinflammation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(3), 731–743.

Matsuda M., & Shimomura I. (2013). Oxidative stress and obesity: their impact on metabolic syndrome. *Metabolic syndrome and neurological Disorders*, 16, 275-281.

Molteni, R., Barnard, R. J., Ying, Z., Roberts, C. K., & Gómez-Pinilla, F. (2002). A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*, 112(4), 803–814.

Molteni, R., Wu, A., Vaynman, S., Ying, Z., Barnard, R.J., & Gomez-Pinilla, F. (2004) Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 123, 429-440.

Monji, A., Utsumi, H., Ueda, T., Imoto, T., Yoshida, I., Hashioka, S., Tashiro, K., & Tashiro, N. (2002). Amyloid-beta-protein (A beta) (25-35)-associated free radical generation is strongly influenced by the aggregational state of the peptides. *Life sciences*, 70(7), 833–841.

Morgan, A. P., Crowley, J. J., Nonneman, R. J., Quackenbush, C. R., Miller, C. N., Ryan, A. K., Bogue, M. A., Paredes, S. H., Yourstone, S., Carroll, I. M., Kawula, T. H., Bower, M. A., Sartor, R. B., & Sullivan, P. F. (2014). The antipsychotic olanzapine interacts with the gut microbiome to cause weight gain in mouse. *PloS one*, 9(12), e115225.

Murase, T., Hattori, T., Ohtake, M., Abe, M., Amakusa, Y., Takatsu, M., Murohara, T., & Nagata, K. (2012). Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 35(2), 186–193.

N

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765), 98–103.

Niewiadomska, G., Mietelska-Porowska, A., & Mazurkiewicz, M. (2011). The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behavioral brain research*, 221(2), 515–526.

Nolan, P. B., Carrick-Ranson, G., Stinear, J. W., Reading, S. A., & Dalleck, L. C. (2017). Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis. *Preventive medicine reports*, 7, 211–215.

Novelli, E. L., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. A., Cicogna, A. C., & Novelli Filho, J. L. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*, 41(1), 111–119.

O

Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*, 72, 219–246.

P

Panchal, S. K., & Brown, L. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 351982.

Panza, F., Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Del Parigi, A., Capurso, S., & Capurso, A. (2004). Mediterranean diet and cognitive decline. *Public health nutrition*, 7(7), 959–963.

Patricio-Martínez, A., Mendieta, L., Martínez, I., Aguilera, J., & Limón, I.D. (2016). The recombinant C-terminal fragment of tetanus toxin protects against cholinotoxicity by intraseptal injection of β -amyloid peptide (25-35) in rats. *Neuroscience*, 315, 18-30.

Paxinos G., & Watson C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic press*. San Diego.

Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G., & Cotman, C. W. (1995). Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 64(1), 253–265.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 9(1), 63–75.e2.

Poudyal, H., Panchal, S., & Brown, L. (2010). Comparison of purple carrot juice and β -carotene in a high-carbohydrate, high-fat diet-fed rat model of the metabolic syndrome. *The British journal of nutrition*, 104(9), 1322–1332.

Pollex, R. L., & Hegele, R. A. (2006). Genetic determinants of the metabolic syndrome. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 3(9), 482–489.

R

- Rakieten, N., Rakieten, M. I., & Nadkarni, M. V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer chemotherapy reports*, 29, 91–98.
- Ramírez, E., Sánchez-Maldonado, C., Mayoral, M. A., Mendieta, L., Alatríste, V., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2019). Neuroinflammation induced by the peptide amyloid- β (25-35) increase the presence of galectin-3 in astrocytes and microglia and impairs spatial memory. *Neuropeptides*, 74, 11–23.
- Rask-Madsen, C., & Kahn, C. R. (2012). Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2052–2059.
- Razay, G., Vreugdenhil, A., & Wilcock, G. (2007). The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 64(1), 93–96.
- Reaven G. M. (2006). The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *The American journal of clinical nutrition*, 83(6), 1237–1247.
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutrition & diabetes*, 10(1), 24.
- Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M. M., & Teplow, D. B. (2009). Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 284(8), 4749–4753.
- Ruanpeng, D., Thongprayoon, C., Cheungpasitporn, W., & Harindhanavudhi, T. (2017). Sugar and artificially sweetened beverages linked to obesity: a systematic review and meta-analysis. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, 110(8), 513–520.

S

- Sáez, E. T., Pehar, M., Vargas, M. R., Barbeito, L., & Maccioni, R. B. (2006). Production of nerve growth factor by beta-amyloid-stimulated astrocytes induces p75NTR-dependent tau hyperphosphorylation in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research*, 84(5), 1098–1106.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, 148(5), 852–871.
- Sarafidis, P. A., & Nilsson, P. M. (2006). The metabolic syndrome: a glance at its history. *Journal of hypertension*, 24(4), 621–626.
- Selvi, Y., Gergerlioglu, H. S., Akbaba, N., Oz, M., Kandeger, A., Demir, E. A., Yerlikaya, F. H., & Nurullahoglu-Atalik, K. E. (2017). Impact of enriched environment on production of tau, amyloid precursor protein and, amyloid- β peptide in high-fat and high-sucrose-fed rats. *Acta neuropsychiatrica*, 29(5), 291–298.
- Schiller D., Eichenbaum H., Buffalo E. A., Davachi L., Foster D. J., Leutgeb S., & Ranganath C. (2015). Memory and space: Towards an understanding of the cognitive map. *Journal of neuroscience*, 35, 13904–13911.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., & Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*, 14(8), 837–842.
- Skovsø S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation*, 5(4), 349–358.
- Solari, N., & Hangya, B. (2018). Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. *The European journal of neuroscience*, 48(5), 2199–2230.

Sposato, V., Canu, N., Fico, E., Fusco, S., Bolasco, G., Ciotti, M. T., Spinelli, M., Mercanti, D., Grassi, C., Triaca, V., & Calissano, P. (2019). The Medial Septum Is Insulin Resistant in the AD Presymptomatic Phase: Rescue by Nerve Growth Factor-Driven IRS₁ Activation. *Molecular neurobiology*, 56(1), 535–552.

Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R. S., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, 18(11), 1085–1088.

Sutton, B. S., Weinert, S., Langefeld, C. D., Williams, A. H., Campbell, J. K., Saad, M. F., Haffner, S. M., Norris, J. M., & Bowden, D. W. (2005). Genetic analysis of adiponectin and obesity in Hispanic families: the IRAS Family Study. *Human genetics*, 117(2-3), 107–118.

Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*, 378(9793), 804–814.

T

Teles-Grilo Ruivo, L. M., & Mellor, J. R. (2013). Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 5, 2.

Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., Lopez-Lopez, G., Muñoz-Arenas, G., Morales-Medina, J. C., Toxqui, V., Venegas, B., & Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, 69(9), 421–433.

U

Ullrich, C., Pirchl, M., & Humpel, C. (2010). Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Molecular and cellular neurosciences*, 45(4), 408–417.

V

Vanhanen, M., Koivisto, K., Moilanen, L., Helkala, E. L., Hänninen, T., Soininen, H., Kervinen, K., Kesäniemi, Y. A., Laakso, M., & Kuusisto, J. (2006). Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology*, 67(5), 843–847.

Vasanji, Z., Cantor, E. J., Juric, D., Moyen, M., & Netticadan, T. (2006). Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *American journal of physiology. Cell physiology*, 291(4), C772–C780.

Velasco, M., Larqué, C., Gutiérrez-Reyes, G., Arredondo, R., Sanchez-Soto, C., & Hiriart, M. (2012) Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic β -cells. *Islets*, 4(4), 302–311.

W

Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., & Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *The Journal of biological chemistry*, 272(35), 22364–22372.

Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of neurochemistry*, 101(5), 1172–1184.

Wagner, A., Dallongeville, J., Haas, B., Ruidavets, J. B., Amouyel, P., Ferrières, J., Simon, C., & Arveiler, D. (2012). Sedentary behaviour, physical activity and dietary patterns are independently associated with the metabolic syndrome. *Diabetes & metabolism*, 38(5), 428–435.

Whitmer, R. A., Gunderson, E. P., Barrett-Connor, E., Quesenberry, C. P., Jr, & Yaffe, K. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 years longitudinal population based study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 330(7504), 1360.

Wiss, D. A., Avena, N., & Rada, P. (2018). Sugar Addiction: From Evolution to Revolution. *Frontiers in psychiatry*, 9, 545.

Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & metabolism*, 13, 65.

Wu, C., Yuen, J., Boyda, H. N., Procyshyn, R. M., Wang, C. K., Asiri, Y. I., Pang, C. C., Honer, W. G., & Barr, A. M. (2014). An evaluation of the effects of the novel antipsychotic drug lurasidone on glucose tolerance and insulin resistance: a comparison with olanzapine. *PLoS one*, 9(9), e107116.

Wu, H.W., Ren, L.F., Zhou, X., & Han, D.X. (2015) A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. *Nutritional neuroscience*, 18(7), 323-328.

Y

Yang, Z. H., Miyahara, H., Takeo, J., & Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & metabolic syndrome*, 4(1), 32.

Yaffe K. (2007). Metabolic syndrome and cognitive decline. *Current Alzheimer research*, 4(2), 123–126.

Z

Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 4, 3.

Zhou, X., Han, D., Xu, R., Li, S., Wu, H., Qu, C., Wang, F., Wang, X., & Zhao, Y. (2014). A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PLoS one*, 9(12), e115148.

Zussy, C., Brureau, A., Keller, E., Marchal, S., Blayo, C., Delair, B., Ixart, G., Maurice, T., & Givalois, L. (2013). Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- β peptide injection in rats. *PLoS One*, 8(1), e53117.

11. Anexos

11.1. Información nutricional de *Rat Diet 5012***Rat Diet****5012*****DESCRIPTION**

Rat Diet is specifically designed to support reproduction, lactation, growth and maintenance of rats. This diet is a complete life cycle diet formulated using managed formulation, delivering Constant Nutrition®. This is paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is low in cholesterol content, with an increased level of unsaturated fatty acids over other rodent diets.

Features and Benefits

- **Managed Formulation delivers Constant Nutrition®**
- Highly digestible formula specifically for rats
- Low cholesterol
- High quality fish meal and plant proteins added to create a superior balance of amino acids for optimum performance

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets)

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	.22.0%
Crude fat not less than	.4.0%
Crude fiber not more than	.5.0%
Ash not more than	.8.0%
Moisture not more than	.12.0%

INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, fish meal, wheat middlings, cane molasses, dehydrated alfalfa meal, soybean oil, ground oats, dried beet pulp, wheat germ, brewers dried yeast, dicalcium phosphate, calcium carbonate, salt, DL-methionine, choline chloride, cholecalciferol, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (source of vitamin K), pyridoxine hydrochloride, vitamin A acetate, biotin, thiamine mononitrate, vitamin B₁₂ supplement, dl-alpha tocopheryl acetate (form of vitamin E), nicotinic acid, calcium pantothenate, riboflavin supplement, manganous oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate.

FEEDING DIRECTIONS

Provide feeders large enough to hold two to three days supply of Rat Diet at any time. Arrange feeders so that animals cannot contaminate feed with feces. Keep plenty of clean, fresh water available to the animals at all times.

Rats- All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

For information regarding shelf life please visit www.labdiet.com.

CHEMICAL COMPOSITION¹**Nutrients²**

Protein , %	.23.2
Arginine, %	.1.49
Cystine, %	.0.38
Glycine, %	.1.13
Histidine, %	.0.60
Isoleucine, %	.0.97
Leucine, %	.1.81
Lysine, %	.1.36
Methionine, %	.0.60
Phenylalanine, %	.1.05
Tyrosine, %	.0.70
Threonine, %	.0.88
Tryptophan, %	.0.26
Valine, %	.1.07
Serine, %	.1.13
Aspartic Acid, %	.2.59
Glutamic Acid, %	.4.67
Alanine, %	.1.37
Proline, %	.1.46
Taurine, %	.0.03
Fat (ether extract) , %	.5.0
Fat (acid hydrolysis) , %	.6.4
Cholesterol, ppm	.174
Linoleic Acid, %	.2.24
Linolenic Acid, %	.0.27
Arachidonic Acid, %	.0.01
Omega-3 Fatty Acids, %	.0.46
Total Saturated Fatty Acids, %	.0.73
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	.0.99
Fiber (Crude) , %	.3.9
Neutral Detergent Fiber ³ , %	.13.3
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	.4.9
Nitrogen-Free Extract (by difference) , %	.51.4
Starch, %	.28.6
Glucose, %	.0.27
Fructose, %	.0.32
Sucrose, %	.3.45
Lactose, %	.0.00
Total Digestible Nutrients , %	.76.0
Gross Energy, kcal/gm	.4.15
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	.3.43
Metabolizable Energy, kcal/gm	.3.07
Minerals	
Ash , %	.6.4
Calcium, %	.0.95
Phosphorus, %	.0.74
Phosphorus (non-phytate), %	.0.45
Potassium, %	.1.15
Magnesium, %	.0.21

Sulfur, %	.0.32
Sodium, %	.0.28
Chloride, %	.0.51
Fluorine, ppm	.21
Iron, ppm	.260
Zinc, ppm	.87
Manganese, ppm	.78
Copper, ppm	.14
Cobalt, ppm	.0.64
Iodine, ppm	.1.0
Chromium (added), ppm	.0.01
Selenium, ppm	.0.39

Vitamins

Carotene, ppm	.1.8
Vitamin K, ppm	.1.3
Thiamin Hydrochloride, ppm	.12
Riboflavin, ppm	.4.5
Niacin, ppm	.80
Pantothenic Acid, ppm	.13
Choline Chloride, ppm	.1900
Folic Acid, ppm	.1.0
Pyridoxine, ppm	.6.5
Biotin, ppm	.0.3
B ₁₂ , mcg/kg	.51
Vitamin A, IU/gm	.12
Vitamin D ₃ (added), IU/gm	.3.4
Vitamin E, IU/kg	.35
Ascorbic Acid, mg/gm	—

Calories provided by:

Protein, %	.27.020
Fat (ether extract), %	.13.103
Carbohydrates, %	.59.877

***Product Code**

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.
2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.
3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.
4. ADF = approximately cellulose and lignin.
5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.

La ficha se obtuvo de la página oficial del proveedor Lab Diet: (<https://www.labdiet.com/Products/StandardDiets/Rodents/index.html>).

11.2. Seguimiento de peso y consumo calórico

Se realizó el registro del peso corporal durante el período de inducción a SMet y posterior a la cirugía estereotáxica. En la figura 37 A se muestra el incremento del peso a través de 180 días en los grupos Control_{inicial} y SMet_{inicial} y posterior a la administración intrahipocampal de SSI o A β ₂₅₋₃₅ en los grupos Control, SMet, A β ₂₅₋₃₅ y SMet+A β ₂₅₋₃₅. En cuanto al registro del consumo energético, se observó un comportamiento variable en el consumo calórico total durante el período de inducción en los grupos Control_{inicial} y SMet_{inicial}, el cual se mantuvo posterior a la lesión y durante la evaluación conductual en los grupos Control, SMet, A β ₂₅₋₃₅ y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (Figura 37 B).

Debido a que fue importante identificar el componente de la dieta con mayor implicación en el desarrollo del SMet, se registró de manera individual el consumo de alimento y solución de sacarosa o agua purificada. Desde el inicio de la inducción, el grupo SMet_{inicial} mantuvo un consumo de alimento significativamente menor (entre un 36 % y hasta un 65% menos, **p< 0.01, ***p< 0.001], comparado con el grupo Control_{inicial}, comportamiento que se conservó posterior a la cirugía estereotáxica en los grupos SMet (disminución del 47% hasta un 67%) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (disminución del 44 % y hasta un 65%) comparados con los grupos Control y A β ₂₅₋₃₅ (Figura 38 A). En cuanto al consumo de agua y solución de sacarosa, se observó que durante el período de inducción el grupo SMet_{inicial} mantuvo un consumo significativamente mayor (26% y hasta un 77%, **p< 0.01, ***p< 0.001) de solución de sacarosa, comparado con el consumo de agua purificada en el grupo Control_{inicial}. Posterior a la cirugía se mantuvo un patrón similar, se observó un consumo elevado de sacarosa en los grupos SMet (de un 30% y hasta un 88%) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ (de un 27% y hasta un 89%) respecto a los grupos Control y A β ₂₅₋₃₅ (Figura 38 B).

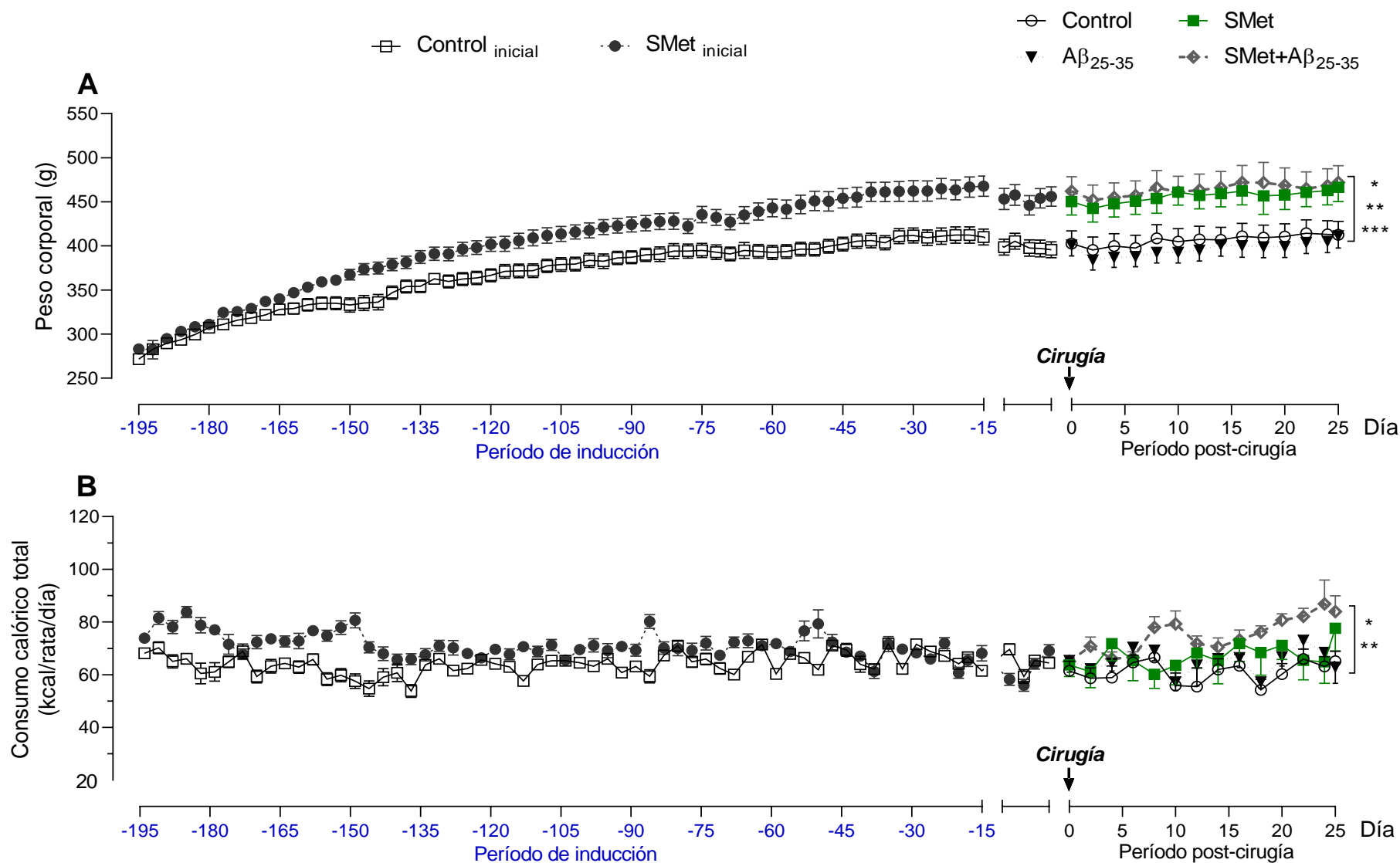


Figura 37. Registro del peso corporal y el consumo calórico total durante todo el protocolo experimental. En **A** se muestra el incremento de peso y en **B** el aporte calórico total durante la inducción en los grupos Control inicial y SMet inicial y posterior a la cirugía en los grupos Control, SMet, A β_{25-35} y SMet+A β_{25-35} . Las gráficas representan el promedio \pm EEM. Los datos se analizaron con una ANOVA de dos vías y post-test Bonferroni, se consideró una * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.001$. Se comparó SMet inicial vs Control inicial y SMet, SMet+A β_{25-35} vs Control y A β_{25-35} .

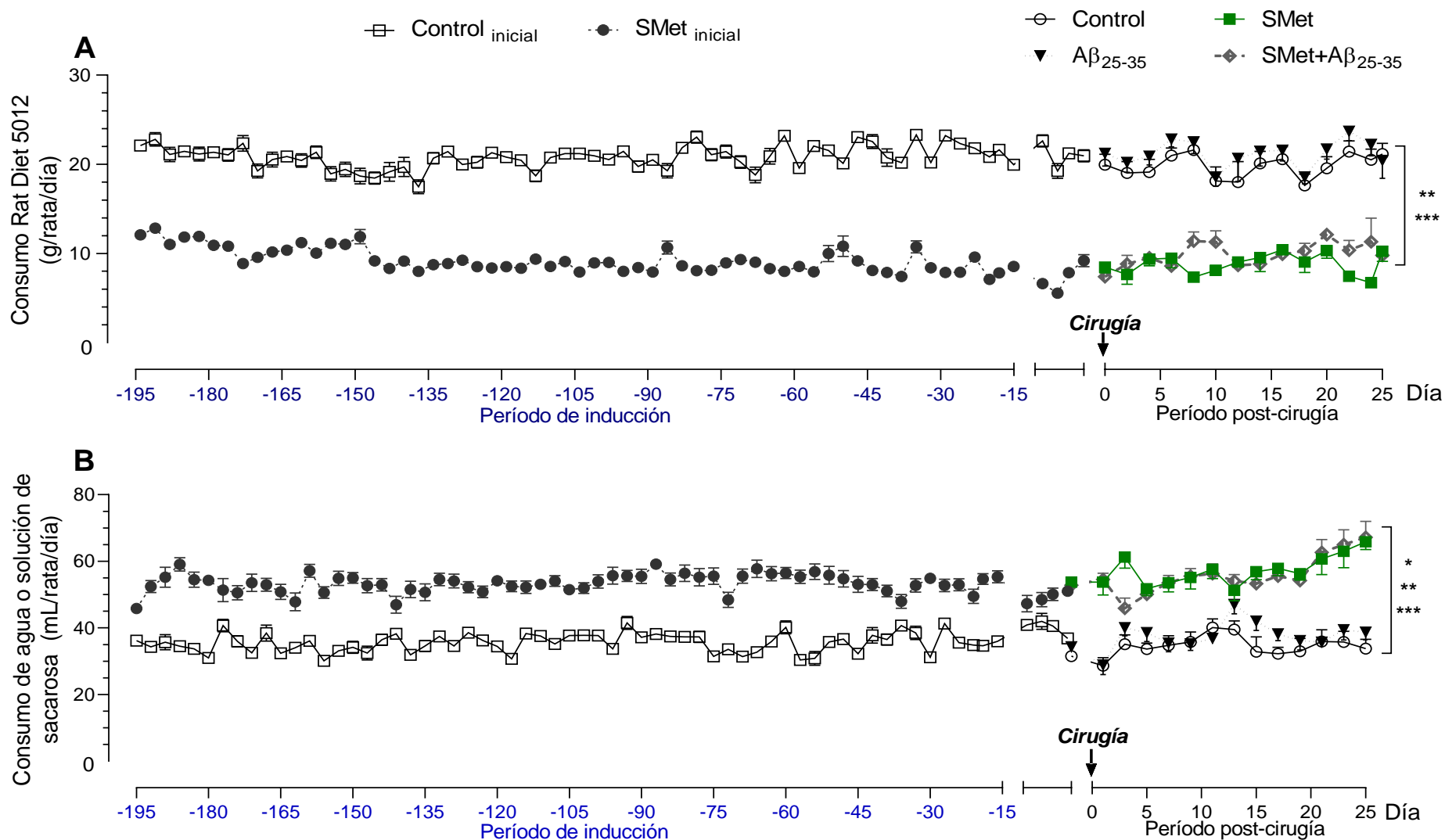


Figura 38. Seguimiento en la ingesta de alimento y agua o solución de sacarosa al 20% durante todo el protocolo experimental. Se graficó en **A** el consumo de alimento Rat Diet 5012 (g/rata/día) y en **B** el consumo de agua o solución de sacarosa al 20% (mL/rata/día) durante el período de inducción a SMet en los grupos Control inicial y SMet inicial, y durante el período post-cirugía en los grupos Control, SMet, Aβ₂₅₋₃₅ y SMet+Aβ₂₅₋₃₅. Las gráficas representan el promedio ± EEM. Los datos se analizaron con una ANOVA de dos vías y post-test Bonferroni, se consideró una *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Se comparó SMet inicial vs Control inicial y SMet, SMet+Aβ₂₅₋₃₅ vs Control y Aβ₂₅₋₃₅.

11.3. El síndrome metabólico y la lesión con el péptido A β ₂₅₋₃₅ no interfieren en el desempeño de las ratas en el laberinto acuático de Morris

Durante el aprendizaje también se registró la distancia recorrida hasta localizar la plataforma y la velocidad promedio (Figura 39). En el primer día de aprendizaje se registró el recorrido promedio más largo, el grupo Control navegó 13.0 ± 1.1 m, el grupo SMet recorrió 14.2 ± 1.1 m y los grupos A β ₂₅₋₃₅ y SMet+A β ₂₅₋₃₅ llegaron a la plataforma en 13.8 ± 1.0 m y 11.9 ± 1.0 m, respectivamente. Con el transcurso de los ensayos, la distancia a la plataforma disminuyó progresivamente en todos los grupos experimentales y en el último día de aprendizaje, se observaron distancias cortas y similares entre los grupos; Control: 3.8 ± 0.8 m, el grupo SMet: 5.3 ± 0.9 m, el grupo A β ₂₅₋₃₅ 3.6 ± 0.6 m y el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅: 3.9 ± 0.7 m, sin embargo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a través de los días de aprendizaje (Figura 39 A, $p > 0.05$).

En relación con la velocidad promedio, todos los grupos comenzaron con una velocidad semejante es decir; Control: 0.19 ± 0.007 m/s, SMet: 0.20 ± 0.007 m/s, A β ₂₅₋₃₅: 0.2 ± 0.008 m/s y SMet+A β ₂₅₋₃₅: 0.19 ± 0.016 m/s, en los siguientes días disminuyó, de modo que en el día 4 de aprendizaje se observó una disminución significativa entre el grupo SMet+A β ₂₅₋₃₅ (0.14 ± 0.008) respecto al grupo SMet (0.17 ± 0.006 , $p < 0.05$), sin embargo en el último día de aprendizaje todos los grupos navegaron con una velocidad similar; Control: 0.17 ± 0.01 m/s, SMet: 0.17 ± 0.007 m/s, A β ₂₅₋₃₅: 0.16 ± 0.009 m/s y SMet+A β ₂₅₋₃₅: 0.14 ± 0.008 m/s y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$, Figura 39 B).

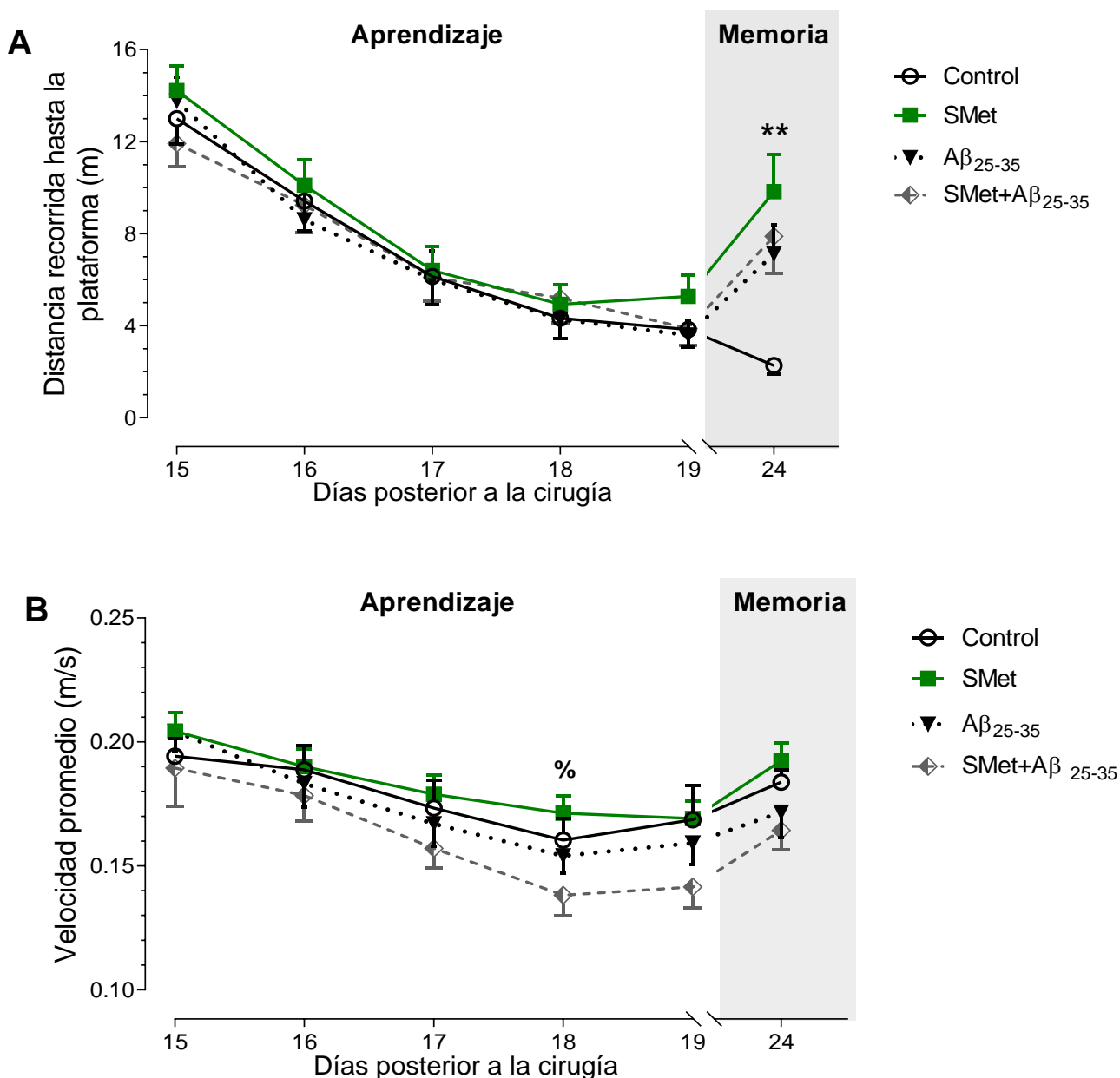


Figura 39. El síndrome metabólico y la lesión con el péptido A β_{25-35} no intervienen la ejecución del nado en el laberinto acuático de Morris. Durante el aprendizaje y la memoria se registró en **A)** la distancia recorrida hasta la plataforma, en **B)** la velocidad promedio en los grupos Control ($n=16$), SMet ($n=19$), A β_{25-35} ($n=14$) y SMet+A β_{25-35} ($n=18$). Durante el aprendizaje se graficó el promedio \pm EEM de 4 ensayos por día. Se analizó con ANOVA de dos vías y post test Bonferroni con valores de % $p<0.05$ SMet comparado con SMet+A β_{25-35} . En la memoria se representó el promedio \pm EEM de 1 solo ensayo. Se analizó con Kruskal Wallis y post test de Dunns con un valor de ** $p<0.01$ respecto a Control.

11.4. El síndrome metabólico y la lesión con el péptido A β ₂₅₋₃₅ no modifican el número de visitas y el tiempo de navegación en la evaluación de la memoria

En el día 24 posterior a la cirugía todos los animales ingresaron al LAM, permitiéndoles navegar en búsqueda de la plataforma durante 90 s. Los registros indicaron que el número de visitas (Figura 40 A) y el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco (Figura 40 B) no difieren estadísticamente ($p > 0.05$) entre los grupos experimentales (Control: 5.8 ± 0.5 , 25.0 ± 1.2 s; SMet: 5.2 ± 0.3 , 22.0 ± 2.7 s; A β ₂₅₋₃₅: 4.6 ± 0.5 , 22.0 ± 1.3 s, SMet+A β ₂₅₋₃₅: $5.3 \pm 0.$, 26.0 ± 1.8 s, respectivamente)

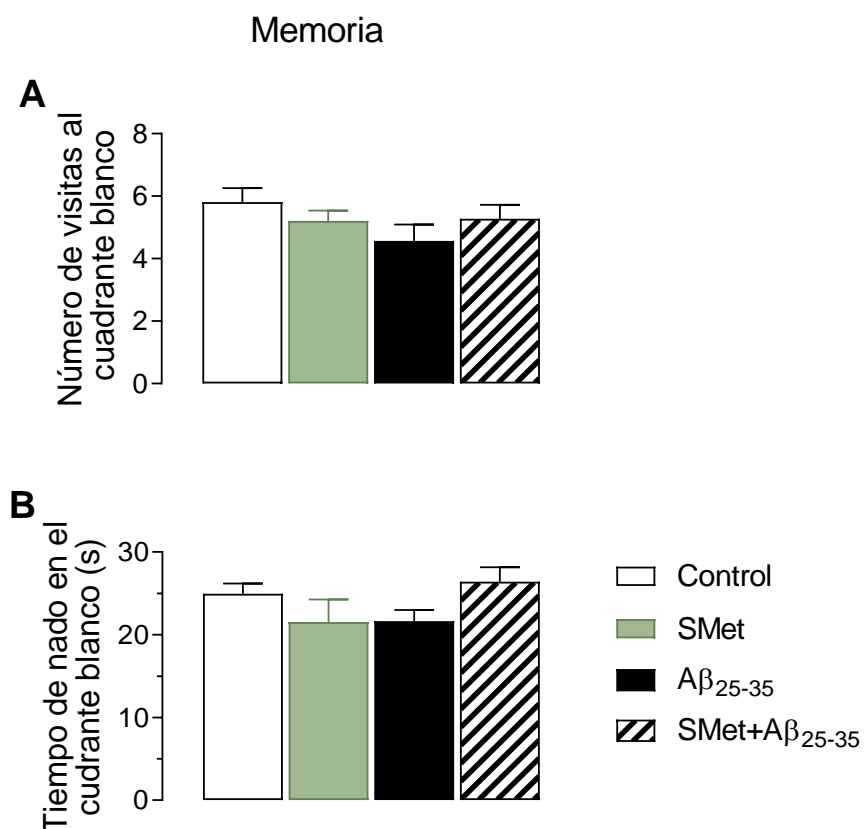


Figura 40. El síndrome metabólico y la lesión con el péptido A β ₂₅₋₃₅ no modifica el número de visitas y el tiempo de navegación en el cuadrante blanco. En la evaluación de la memoria se registró en **A)** el número de visitas y **B)** el tiempo de navegación en el cuadrante blanco en los grupos Control ($n=16$), SMet ($n=19$), A β ₂₅₋₃₅ ($n=14$) y SMet+A β ₂₅₋₃₅ ($n=18$). Se graficó el promedio \pm EEM de un ensayo. Se analizó con Kruskal Wallis y post test Dunns considerando un valor de $p < 0.05$.



La administración intrahipocampal del amiloide- β_{25-35} no daña la memoria y disminuye la microgliosis en núcleos colinérgicos de ratas con síndrome metabólico

Reyes Castro Olivia¹ (Estudiante de maestría), Gómez de los Santos Berenice¹, Patricio Martínez Aleidy^{1,2}, Luna Morales Félix³, Limón Pérez de León Ilhuicamina Daniel¹.

¹Laboratorio de Neurofarmacología. FCQ-BUAP. ²Facultad de Ciencias Biológicas-BUAP.

³Laboratorio de Neuroendocrinología FCQ-BUAP

El síndrome metabólico (SMet) conduce a la neuroinflamación y el deterioro cognitivo. La inyección del Amiloide- β_{25-35} ($A\beta_{25-35}$), modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, daña las vías colinérgicas en el cerebro basal anterior y conduce a la denervación colinérgica que disrumpe la vía septo-hipocampo. Nuestro objetivo fue evaluar la memoria espacial y la respuesta de astrocitos y microglía en núcleos colinérgicos de ratas con SMet más la lesión intrahipocampal con el $A\beta_{25-35}$. Se utilizaron ratas machos *Wistar* (250-280 g). El grupo SMet consumió una solución de sacarosa al 20% y el control (C) agua purificada. Cincuenta y seis días después, se caracterizó el modelo de SMet. Posteriormente, todas las ratas se sometieron a cirugía estereotáxica para la inyección de $1\mu\text{L}$ de SSI o $A\beta_{25-35}$ [$100\mu\text{M}$] en la CA1 del hipocampo (AP: -4.0, L: ± 2.3 , P: -2.6). Los grupos fueron C+SSI, SMet+SSI, C+ $A\beta_{25-35}$ y SMet+ $A\beta_{25-35}$. Quince días post-cirugía inició el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris (LAM) y diez días después se evaluó la memoria. Se obtuvieron los cerebros para evaluar la inmunoreactividad de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y la molécula adaptadora de unión a calcio ionizable (Iba-1) en *septum medial* (SM), la banda horizontal y vertical de Broca (BHB y BVB). Nuestros resultados indican que el grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ no muestra cambios significativos en la memoria evaluada en el LAM, respecto al grupo C+ $A\beta_{25-35}$. En la evaluación de la inmunoreactividad, en el grupo C+ $A\beta_{25-35}$, el área teñida para Iba1 incrementó en SM (16%), BHB (45%) y BVB (30%) respecto al grupo C+SSI, sin cambios en GFAP en las mismas regiones. El grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ el área teñida para Iba1 disminuyó en SM (20%), BVB (27%) y en BHB (31%), respecto al C+ $A\beta_{25-35}$, sin modificación en las mismas áreas para GFAP. Concluimos que el grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ no evidenció daño en la memoria y disminuyó la microgliosis en regiones colinérgicas respecto al grupo C+ $A\beta_{25-35}$.



LXII CONGRESO NACIONAL
DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

QUERÉTARO 2019

DEL 11 AL 15
DE AGOSTO



Análisis temporal del síndrome metabólico sobre la memoria espacial en rata administrada intrahipocampalmente con el amiloide- β_{25-35}

Reyes Castro Olivia¹ (Estudiante de maestría), Grisela Morales Flores ¹, Patricio Martínez Aleidy^{1,2}, Limón Pérez de León Ilhuicamina Daniel¹.

¹Laboratorio de Neurofarmacología. FCQ-BUAP. ²Facultad de Ciencias Biológicas-BUAP.

En diversos modelos experimentales el consumo de dietas hipercalóricas puede generar deterioro cognitivo y depende del periodo de exposición a la dieta sin embargo, los reportes que relacionen el desarrollo de síndrome metabólico (SMet) y su efecto sobre el aprendizaje y la memoria espacial son escasos. Considerando que el SMet es un factor de riesgo para desarrollar déficit cognitivo, es posible estudiar su relación mediante la administración del péptido amiloide- β_{25-35} ($A\beta_{25-35}$) en regiones de interés cognitivo. El objetivo fue comparar el efecto del SMet a los dos y seis meses de inducción sobre el aprendizaje y memoria espacial en ratas con lesión intrahipocampal con el $A\beta_{25-35}$. Se formaron dos grupos experimentales de ratas macho *Wistar* (250-280 g); el grupo SMet consumió una solución de sacarosa al 20% durante dos (2m) y seis meses (6m) paralelo al grupo Control, que mantuvo agua purificada (C). Al término del periodo de exposición, el SMet fue caracterizado. Posteriormente, todas las ratas se sometieron a cirugía estereotáxica para la inyección de 1 μ L de Vehículo o $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] en la CA1 del hipocampo (AP: -4.0, L: \pm 3.0, P: -2.6). Los grupos fueron C+Vehículo, SMet+Vehículo, C+ $A\beta_{25-35}$ y SMet+ $A\beta_{25-35}$, 2m y 6m para cada grupo. Quince días post-cirugía inició el aprendizaje en Laberinto acuático de Morris (LAM) y diez días después se evaluó la memoria. Los resultados muestran que en el primer día de aprendizaje, el grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ 6m incrementó significativamente la latencia al escape (48%) respecto al SMet+ $A\beta_{25-35}$ 2m. En la evaluación de la memoria, el grupo SMet+ $A\beta_{25-35}$ 6m permanece más tiempo en el cuadrante blanco (96%), sin modificar significativamente la latencia al primer cruce y el número de visitas a la zona de la plataforma. Concluimos que el daño en el aprendizaje y la memoria espacial evaluado en el LAM del modelo de SMet+ $A\beta_{25-35}$ se exagera en periodos largos de exposición a la dieta que genera el modelo de SMet.



NOVEMBER 3-7
SAN DIEGO, CA



Metabolic syndrome plus injection of amyloid- β 25-35 peptide into hippocampus not impairs spatial memory and decreased microgliosis in cholinergic regions

Reyes-Castro O.^{1,2}, Patricio-Martínez A.^{1,3}, Luna-Morales F^{2,4}. Limón I.D.^{1,2}

¹Lab. Neurofarmacología -Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. ²Posgrado en Ciencias Químicas-Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

³Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. ⁴Lab. Neuroquímica -Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

Metabolic syndrome (MetS) can lead neuroinflammation and cognitive impairment. The injection of Amyloid- β_{25-35} peptide ($A\beta_{25-35}$) into cognitive regions induces oxidative stress, neuroinflammation, neuronal death and impairs spatial memory. Particularly, cholinergic nucleus in basal forebrain trigger a neuroinflammatory response in presence of $A\beta_{25-35}$, but we do not know how basal forebrain response in presence of MetS+ $A\beta_{25-35}$ when $A\beta_{25-35}$ is injected in an innervated cholinergic region as hippocampus (Hp). The aim of our study was evaluated the spatial memory, microglia and astrocyte response in cholinergic nucleus of MetS plus $A\beta_{25-35}$ hippocampal injured rats. MetS group was obtained by consumption of 20% sucrose in drinking water meanwhile control group (C) received tap water. At eight weeks of treatment, MetS model was evaluated. After, all rats were yield to stereotaxic surgery to the injection of vehicle or $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] into CA1 subfield of Hp, (coordinates; AP: -4.0, L: \pm 2.3, P: -2.6). The experimental groups were C+Vehicle, MetS+Vehicle, C+ $A\beta_{25-35}$ and MetS+ $A\beta_{25-35}$. At 15th day post-surgery, experimental groups were tested for spatial learning in the Morris water maze (MWM) and 5 days later, were memory tested. We obtained the brains to assess the immunoreactivity of glial fibrillar acid protein (GFAP) and the ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) in medial septal nucleus (MS), the vertical nucleus of diagonal band (VDB) and the horizontal limb of diagonal band (HDB). We found that MetS+ $A\beta_{25-35}$ not modified spatial learning and memory in the MWM compared to the C+Vehicle. Regarding to microglia and astrocyte immunoreactivity, C+ $A\beta_{25-35}$ exhibited increases of Iba-1 stained area in MS (16%), HDB (45%) and VDB (30%) meanwhile GFAP immunoreactivity did not modify in the same subfields compared to the C+Vehicle. Beside MetS+Vehicle reduced the GFAP stained area in HDB (47%) compared to the C+Vehicle and MetS+ $A\beta_{25-35}$ increased GFAP immunoreactivity in VDB (51%) and in HDB (124%) compared to the SMet+Vehicle. Finally, MetS+ $A\beta_{25-35}$ reduced Iba-1 stained area in MS (20%), VDB (27%) and HDB (31%) compared to the C+ $A\beta_{25-35}$. We found that the injection of $A\beta_{25-35}$ [100 μ M] into CA1subfield of Hp in MetS model, not impair spatial learning and memory tested in MWM, decrease the microglia reactivity in cholinergic nucleus and astrocyte reactivity differs in MetS model with or without neurotoxic lesion.



October 19–23
Chicago, IL



Temporal analysis of spatial learning and memory in metabolic syndrome model plus hippocampal injection of amyloid- β 25-35 peptide

Reyes Castro Olivia¹, Grisela Morales Flores¹, Patricio Martínez Aleidy^{1,2}, Limón Pérez de León Ilhuicamina Daniel¹.

¹Laboratorio de Neurofarmacología. FCQ-BUAP. ²Facultad de Ciencias Biológicas-BUAP.

The effect of Metabolic Syndrome (MetS) on spatial learning and memory and the temporal effect of the induction of this experimental model has not been thoroughly reported. In our laboratory, we use the injection of amyloid- β ₂₅₋₃₅ peptide ($A\beta$ ₂₅₋₃₅) to investigate some neurotoxic mechanisms and memory impairment in rats, in association with Alzheimer's disease. The aim of this work was to evaluate if MetS at 2 and 6 months of induction produce a differential effect on spatial learning and memory in hippocampal lesioned rats with the $A\beta$ ₂₅₋₃₅. We used *Wistar* male rats (250-280 g) randomly assigned in MetS and Control (C) group. MetS model was obtained by consumption of 20% sucrose solution meanwhile C received drinking water, *ad libitum* for two (2mo) and six (6mo) months in separate cohort of rats. At the end of each period, the MetS model was evaluated. After, all rats were yielded to stereotaxic surgery to the injection of vehicle or $A\beta$ ₂₅₋₃₅ [100 μ M] into CA1 subfield of Hippocampus, (coordinates; AP: -4.0, L: \pm 2.3, P: -2.6). The experimental groups were C+Vehicle, MetS+ Vehicle, C+ $A\beta$ ₂₅₋₃₅ and MetS+ $A\beta$ ₂₅₋₃₅ 2mo and 6mo for each cohort of rats. At 15th day post-surgery, experimental groups were tested for spatial learning in Morris Water Maze (MWM) and 5 days later, were memory tested. Our finding indicates that MetS+Vehicle 2mo does not impair learning and memory in MWM. Regarding to MetS+ $A\beta$ ₂₅₋₃₅ 6mo, showed an increase in the scape latency on 15, 16 and 17 days post surgery compared to MetS+ $A\beta$ ₂₅₋₃₅ 2mo. The MetS+Vehicle 6mo exhibited memory impairment with an increase in latency to the first crossing at platform zone (40%) and decrease de crossing number (41%) at this site. We conclude that the induction time on MetS is determining to cause damage in spatial learning and exacerbate the memory impairment evaluated in MWM probably by a disturbance of neuronal function associated with oxidative stress, neuroinflammation and loss of neurochemical communication, therefore it is necessary to evaluate proteins involved in modulation of spatial learning and memory.