



# **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

**TESIS PROFESIONAL**

***“Efecto de la administración del ácido gálico sobre la estructura y función de neuronas del hipocampo en ratas con síndrome metabólico y sus consecuencias sobre la memoria de reconocimiento.”***

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**Karen Caporal Hernández.**

**DIRECTOR DE TESIS**

**D.C ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA**

**D.C. MARÍA DE GUADALUPE MUÑOZ ARENAS**

**ASESOR DE TESIS**

**D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA**

**12 DICIEMBRE 2018**

## **ABREVIATURAS.**

**AACE:** Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos

**ACV:** Accidente cerebrovascular

**ADA:** Acta para personas con discapacidades

**AG:** Ácido gálico

**AGCC:** Ácidos grasos de cadena corta

**AGEs:** Glicosilación avanzada de productos finales

**ARA:** Antagonistas de los receptores de angiotensina II

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ASB:** Albúmina sérica de bovino

**AT1:** Receptor de angiotensina I

**BHE:** Barrera hematoencefálica

**CA:** Cuerno de amon

**CAD:** Enfermedad arterial coronaria

**Casp-3:** Capasa 3

**CAT:** Catalasa

**CBF:** Flujo sanguíneo cerebral

**CE:** Colesterol esterificado

**CETP:** Proteína transportadora de esteres de colesterol

**DAPI:** 2,4-diamino-2-fenilindol

**DCL:** Deterioro cognitivo leve

**DM:** Diabetes mellitus

**DMT-2:** Diabetes mellitus tipo 2

**Dva:** Demencia vascular

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**EAC:** Enfermedad arterial coronaria

**ECNT:** Enfermedades crónicas no transmisibles

**ECV:** Enfermedad cardiovascular

**EROs:** Especies reactivas de oxígeno

**ESH/ESC:** Sociedad Europea de hipertensión/Sociedad Europea de cardiología

**ESM:** Media +/- el error estándar

**FC:** Flujo cerebral

**FFA:** Ácidos grasos libres

**FITC:** fluoresceína 5-isotiocinato

**GI:** Índice glucémico

**GLP-1:** Péptido similar al glucagon-1

**GLUT:** Transportador de glucosa

**GLUT-1:** Transportador de glucosa 1

**GLUT-4:** Transportador de glucosa 4

**GPx:** Glutación peroxidasa

**GR:** Glutación reductasa  
**GSIS:** Secreción de insulina estimulada por glucosa  
**H&E:** Hematoxilina y eosina  
**H2O2:** Peróxido de hidrogeno  
**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad  
**HL:** Lipasa hepática  
**HOMA:** Evaluación del modelo de la homeostasis  
**IDF:** Federación Internacional de Diabetes  
**IDL:** Lipoproteínas de densidad intermedia  
**IECA:** Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina  
**IgG:** Inmunoglobulina G  
**IL-6:** Interleucina 6  
**IMC:** Índice de masa corporal  
**LCR:** Líquido cefalorraquídeo  
**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad  
**LDLR:** Receptor de lipoproteínas de baja densidad  
**LMA:** Lesiones en materia blanca  
**LPL:** Lipoproteína lipasa  
**LRP:** Proteína relacionada a la lipoproteína  
**MCI:** Deterioro cognitivo leve  
**MUFA:** Ácidos grasos monoinsaturados  
**NADPH:** Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato  
**NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica  
**NCEP-ATP III:** El Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol-Panel de Tratamiento de A III  
**NEFA:** Ácidos grasos libres no esterificados  
**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas  
**NMDA:** N-metil-D-aspartato  
**NO:** Óxido nítrico  
**NORT:** Prueba de reconocimiento de objetos novedosos  
**NOS-2:** Óxido nítrico sintasa  
**NSQ:** Núcleo supraquiasmático  
**O2:** Oxígeno  
**OH:** hidroxilo  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**P.A.:** Presión arterial  
**PAD:** Presión arterial diastólica  
**PAI-1:** Inactivador de plasminógeno 1  
**PAS:** Presión arterial sistólica  
**PBS:** Buffer salino de fosfatos  
**PCR:** Proteína C reactiva

**PUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados  
**RAAS:** Renina-angiotensina-aldosterona  
**RCV:** Resistencia cerebrovascular  
**RI:** Resistencia a la Insulina  
**SFA:** Ácidos grasos saturados  
**SM:** Síndrome metabólico  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**SOD:** Súper óxido dismutasa  
**SOP:** Síndrome de ovario poliquístico  
**SSI:** Solución salina isotónica  
**Syn:** Sinaptofisina  
**TG:** Triglicéridos  
**TNF- $\alpha$ :** Interferón alfa  
**VaD:** Demencia vascular  
**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad  
**VMR:** Reactividad vaso motora

## **ÍNDICE.**

### **1.0 INTRODUCCIÓN**

**1.1 Definición de síndrome metabólico (SM).**

**1.2 Dislipidemia.**

**1.3 Incorporación de los factores del SM.**

**1.4 Prevalencia de SM en México.**

**1.5 Diagnóstico del SM**

**1.6 Regulación bioquímica de la dieta.**

**1.7 Hiperglucemia.**

**1.8 Insulina y resistencia a la insulina (RI)**

**1.8.1 ¿Cómo se provoca la resistencia a la insulina?**

**1.9 Alteraciones en la regulación bioquímica de la dieta y sus implicaciones fisiológicas.**

**1.10 Obesidad abdominal, SM y su relación con vascularización cerebral**

**1.11 Relación entre SM y cerebro**

**1.12 Relación SM, circulación cerebral y cognición**

**1.13 Implicación del SM a nivel cerebral**

**1.14 El SM, estrés oxidativo y su relación con el deterioro cerebral**

**1.15 El hipocampo y la memoria**

**1.16 La Farmacoterapéutica para el SM**

**1.17 Otras estrategias de intervención para el SM**

**1.18 Uso de antioxidantes como método alternativo al tratamiento contra el daño que produce el SM**

**1.19 Flavonoides**

**1.20 Efecto del ácido gálico como protector neuronal y antioxidante sistémico.**

## **2.0 JUSTIFICACIÓN.**

### **3.0 HIPÓTESIS.**

### **4.0 OBJETIVO.**

#### **4.1 Objetivo general.**

#### **4.2 Objetivos específicos.**

### **5.0 METODOLOGÍA.**

#### **5.1 Pruebas conductuales (prueba de NORt).**

#### **5.2 Eutanasia y obtención de las muestras.**

#### **5.3 Inclusión en parafina**

#### **5.4 Técnicas histológicas e histoquímicas**

### **6.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

### **7.0 RESULTADOS.**

#### **7.1 El AG disminuye las alteraciones zoométricas en ratas con SM.**

#### **7.2 El AG disminuye el daño que produce el SM en los procesos de aprendizaje y memoria a corto y a largo plazo.**

#### **7.3 El AG disminuye los niveles séricos de insulina, glucosa y las fracciones lipídicas incrementados por el SM.**

#### **7.4 El AG disminuye el daño a células beta-pancreáticas, el riesgo a RI y el índice de riesgo cardíaco.**

#### **7.5 Efecto del AG sobre la morfología celular de las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratas con SM.**

#### **7.6 El AG disminuye el daño que produce el SM sobre la inmunorreactividad de las células del hipocampo a Sinaptofisina (Syn).**

#### **7.7 El AG disminuye la inmunorreactividad de Caspasa-3 (Casp-3) ocasionada por el SM.**

#### **7.8 El AG disminuye la inmunorreactividad de NOs2 en condiciones de SM.**

**8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.**

**9.0 CONCLUSIÓN.**

**10.0 PERSPECTIVAS.**

**11.0 BIBLIOGRAFÍA**

## **ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.**

**Tabla 1.** Descripción de los efectos inducidos por el SM en la vascularización y la circulación y sus efectos en la cognición.

**Tabla 2.** Descripción de la dieta normocalórica.

**Tabla 3.** Descripción de la dieta hipercalórica/hiperglúcida.

**Tabla 4.** Evaluación de los valores séricos de animales con SM tratados con AG.

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas séricas de las fracciones lipídicas.

**Tabla 6.** Obtención de los índices HOMA de todos los grupos de estudio.

**Tabla 7.** Índices generados a través de los resultados séricos de los grupos de análisis.

**Tabla 8.** Resultados del índice aterogénico y riesgo cardiovascular de los cuatro grupos

**Figura 1.** Esquemización del hipocampo con sus tres vías aferentes.

**Figura 2.** Diagrama de trabajo.

**Figura 3.** Distribución de los sujetos de estudio.

**Figura 4.** Descripción gráfica de la prueba de NORt.

**Figura 5.** Efecto del AG sobre los parámetros zoométricos inducidos por el SM.

**Figura 6.** Efecto del AG sobre el IMC y el índice de Lee en animales sanos y con SM.

**Figura 7.** Evaluación de la distancia recorrida por animales con SM tratados con AG.

**Figura 8.** Evaluación del tiempo de exploración de animales con SM tratados con AG.

**Figura 9.** Evaluación del índice de reconocimiento a corto plazo en grupos de animales con SM tratados con AG.

**Figura 10.** Evaluación del índice de reconocimiento a largo plazo en grupos de animales con SM tratados con AG.

**Figura 11.** Microfotografías tinción técnica Hematoxilina-Eosina.

**Figura 12.** Microfotografías tinción técnica inmunohistoquímica Syn.

**Figura 13.** Microfotografías tinción técnica inmunohistoquímica Casp-3

**Figura 14.** Microfotografías tinción técnica inmunohistoquímica NOs2.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO (SM).

A nivel mundial no existe una forma oficial que unifique todos los criterios que han sido propuestos para definir de manera universal al SM. En septiembre de 2011 se celebró una reunión con los jefes de estado y de gobierno de las naciones unidas donde se evaluó la prevención y control de las ECNT a nivel mundial entre las que destaca el SM considerado como antecedente de morbilidad y mortalidad cardiovascular por lo que la identificación oportuna de pacientes con este padecimiento es de gran importancia tanto a nivel médico como social y económico ya que su identificación temprana permitirá un importante cambio en la calidad de vida de quien lo padezca brindando tratamientos preventivos a las complicaciones del mismo (Khaled *et al.*, 2017).

Debido a que es un conjunto de desórdenes, su etología y definición están en controversia lo que dificulta su análisis y seguimiento a nivel de investigación dificultando la comparación de resultados y las conductas a evaluar para el seguimiento. La diferencia entre los conceptos propuestos varia no solo en los nombres si no en la relación de los componentes que le comprenden y los puntos de corte establecidos para cada uno de ellos (Bello *et al.*,2012)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que si un individuo presenta una de las cuatro condiciones siguientes se considera que padece SM:

- Diabetes Mellitus (DM)
- Intolerancia a la glucosa
- Hiperglucemia en ayunas
- Resistencia a la insulina

Aunado a esto deberá presentar la existencia de dos o más de los siguientes criterios:

- Presión arterial: mayor o igual a 140/90 mmHg (valor normal: 130/85mmHg)
- Dislipidemia: con valores de triglicéridos (TG) mayor o igual 169.5mmol/dL (valor normal: menor a 150mmol/dL) y/o HDL en hombres menor o igual a 34.7mg/dL y en mujeres menor o igual a 38.6mg/dL (valor normal: superior a 60mg/dL).
- Obesidad central: se evalúa mediante dos métodos, la relación cintura/cadera en hombres mayor a 90cm y en mujeres mayor a 85cm o bien mediante el índice de masa corporal (IMC) mayor a 30kg/m<sup>2</sup>
- Microalbúmina: en excreción urinaria de albumina mayor o igual a 20mg/min o bien en relación albúmina/creatinina en orina mayor o igual a 30 mg/g en 24 horas (valor normal: menor a 30mg/g).

(Lizarzaburu *et al.*, 2013)

## **1.2 Dislipidemia.**

La acumulación de grasa visceral está asociada con alteraciones en el metabolismo de lípidos dando como resultado hipertrigliceridemia, niveles bajos de HDL-C y altos de LDL así como un exceso de AGL lo que es característico del SM que también se observa en individuos con DMT2 (González *et al.*,2017).

Los triglicéridos elevados, sus proteínas remanentes y las LDL provocan placas aterogénicas lo que aumenta el riesgo de una enfermedad coronaria, las HDL protegen contra este proceso eliminando el exceso de colesterol en tejidos periféricos e inhibiendo la oxidación de lipoproteínas, si hay niveles bajos el sistema se encuentra desprotegido, propiciando un aumento de aterosclerosis, como se observa en SM (Daskalova *et al.*, 2015).

Cuando la dislipidemia está asociada a RI se ven afectadas todas las fracciones de lípidos y se caracteriza por triglicéridos elevados en ayunas, lipoproteínas remanentes elevadas, bajo nivel de HDL y partículas LDL pequeñas y densas (Wilcox *et al.*, 2005).

Diversos estudios relacionan la hiperlipidemia, RI, presión arterial elevada, ECV y enfermedad arterial coronaria (EAC). Existe posibilidad de que la dislipidemia de SM se relacione con el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) que tiene un papel crucial en la regulación de la presión arterial (Mellendijk *et al.*, 2013).

### **1.3 Incorporación de los factores del SM.**

Todos los factores mencionados anteriormente, aunados a la RI son los considerados factores clave en el progreso del SM y sus afectaciones en la vascularización cerebral. La relación más probable es la disminución de antioxidantes y otros micronutrientes encargados de la protección celular. Como ya se mencionó la obesidad visceral induce RI, un estado pro-inflamatorio y disfunción endotelial dando como resultado alteraciones metabólicas, conduciendo a un proceso de dislipidemia aterogénica hiperglucemia e hipertensión lo que también altera de forma estructural y funcional la vascularización contribuyendo al desarrollo de la enfermedad cerebral de vasos pequeños afectando también la función del mismo (Mellendijk *et al.*, 2013).

### **1.7 Prevalencia de SM en México.**

En México un gran porcentaje de la población es susceptible a padecer SM debido a sus antecedentes genéticos, al estilo de vida y al tipo de educación nutricional que se tiene. Según Aguilar-Salinas y siguiendo los criterios de la OMS la prevalencia del SM en México es de 13.6% mientras que, según los criterios de NCEP-ATPIII es de 26.6% tan solo en personas entre los 20 y 69 años, entre tanto González-Villalpando notifica un 39.9 y 59.9% para hombres y mujeres correspondientemente según el criterio de las guías de NCEP-ATPII 2004. En niños y adolescentes es de 20% y se relaciona estrechamente con el sobrepeso y la obesidad. El porcentaje de prevalencia varía según el tipo de organización tomada como referencia y al

traducirlo en números, alrededor de 6.7 y 14.3 millones de mexicanos se encuentran afectados tomando en cuenta sólo los criterios de la OMS y ATP-III respectivamente, como los más representativos (Hernández *et al.*, 2009).

México gasta 42 mil millones de pesos al año en la atención de la obesidad y las complicaciones que incluye, aunado a esto, las pérdidas por la productividad del personal que padece ECNT ascienden hasta 25 mil millones que se cargan directamente a los contribuyentes, dando un total de 67 mil millones de pesos como gasto anual (Secretaría de Salud 2012).

### **1.8 Diagnóstico del SM**

Grupos de expertos en conjunto con organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III) y la American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) han propuesto sus criterios diagnósticos o componentes clave del síndrome metabólico debido a la importancia que tiene al identificar grupos vulnerables a DM2 y ECV (Lizarzaburu *et al.*, 2013).

En 2005 la Federación Internacional de diabetes (IDF), publicó sus principios para diagnosticar SM los cuales han tenido importante difusión. Estos criterios indican que si una persona padece obesidad abdominal, la cual se denota por el perímetro de la cintura, y cuyo límite paramétrico de referencia tiende del sexo, edad y origen étnico, en el caso de América latina hasta esa fecha se tomaban valores aplicables al sudeste de Asia (90cm para varones y 80 cm en mujeres), si se excede se busca la existencia de dos alteraciones más como hiperglucemia, dislipidemia o hipertensión, confirmando a la persona con SM (Alberti *et al.*, 2005).

También se considera el valor de índice de masa corporal (IMC) según la ecuación de Quetelet donde se evalúa si el individuo se encuentra con sobrepeso o algún tipo

de obesidad. Teniendo estos dos parámetros en cuenta, se evalúa la presión arterial que se considera está estrechamente relacionada con estas patologías (Bello *et al.*, 2012).

Para el diagnóstico también se incluye la valoración de resultados séricos donde se evalúan los niveles de distintos tipos de lipoproteínas como VLDL, HDL y LDL, que brindan información respecto a dislipidemias y el estado aterogénico del paciente, asociado (Panzaa *et al.*, 2010).

Para la unificación de criterios, Harmonizing the Metabolic Syndrome sugiere tomar en cuenta:

- El aumento de la circunferencia abdominal (según el parámetro de cada país y región).
- Cuantificación de triglicéridos (igual o mayor a 150mg/dL).
- Baja de HDL (menor al 40% en hombres y menor al 50% en mujeres).
- Hipertensión arterial sistólica (igual o mayor a 130mmHg) y/o hipertensión arterial diastólica (igual o mayor a 85mmHg).
- Niveles de glucosa basal elevados (igual o mayor a 100mg/dL).

Si el paciente presenta tres de los cinco puntos mencionados y no padece diabetes, hipertensión arterial o dislipidemia, se considera portador de SM, lo cual limita su aplicación (Lizarzaburu *et al.*, 2013).

### **1.9 Regulación bioquímica de la dieta.**

El equilibrio nutricional se rige por medio de la ingesta y el gasto de energía, tomando en cuenta el gasto basal y el gasto por esfuerzo físico. La energía se adquiere en forma de alimentos, una vez que son ingeridos durante el periodo postprandial comienza la regulación en el hipotálamo a nivel de Sistema Nervioso central (SNC) del núcleo supraquiasmático (NSQ) encargado de la transcripción y

transcripción de las señales a nivel nutrición en gran parte de los órganos y tejidos (Kohsaka *et al.*, 2006).

Cuando el nivel calórico se encuentra alterado ya sea por disminución o aumento, se pierde el control a nivel SNC. Este tipo de alteraciones pierde la regulación de genes involucrados con la lipogénesis, catabolismo lipídico y gluconeogénesis alterando el ciclo circadiano celular. Las alteraciones a nivel genético son más susceptibles según el tipo de población, edad y género en la que se presenten, la capacidad de amortiguación tiende del estado de órganos y tejidos especializados en digestión, conversión y almacenamiento de nutrientes y energía tal como el páncreas, hígado, adipocitos, musculo y tracto gastrointestinal (Yang *et al.*, 2006).

Una vez que se da la alteración se secretan hormonas que a través de torrente sanguíneo llegan a todos los tejidos ya mencionados hasta llegar al núcleo arcuato el cual a través de las neuronas envía la información de resguardo grasa y balance energético liberando neuropéptidos que estimulan o suprimen el apetito. Para que no haya ninguna ganancia energética por la ingesta, las cantidades de insulina y leptina que son enviadas a circulación deben ser proporcionales a la cantidad de grasa y carbohidratos absorbidos y resguardados (Wynne *et al.*, 2005).

Si la glucosa en circulación aumenta, el páncreas secreta mayor insulina activando diversas rutas en tejidos periféricos, la glucosa que no fue utilizada en las rutas energéticas es recogida por el hígado y almacenada en forma de glucógeno, parte de esta entra a la biosíntesis de triglicéridos empaquetados en partículas grandes que son transportados por VLDL que los llevan a tejido adiposo y musculo (Beckerman *et al.*, 2009).

En estado de ayuno la energía se toma del tejido adipocitario de tejidos periféricos. El páncreas libera glucagón y el hígado libera glucosa y glucógeno iniciando el

proceso de gluconeogénesis, bloqueando las rutas de glucólisis y activando la oxidación de ácidos grasos, generando cuerpos cetónicos que sirven de reserva energética al disminuir la glucosa (Wynne *et al.*, 2005).

En desordenes como el SM estas vías de regulación se alteran perdiendo la armonía entre secreción, gasto y almacenamiento, principalmente por el desajuste hormonal que propicia y sus expresiones a corto, mediano y largo plazo varían, según el estado nutricional relacionado a la sobre ingesta y los tiempos prolongados de ayuno (Beckerman *et al.*, 2009).

Cuando las regulaciones fallan se da inicio a una cascada de desórdenes que alteran la respuesta hormonal y neuronal por lo que la respuesta neuro-endocrina encargada del manejo de los metabolitos energéticos como los triglicéridos y los ácidos grasos libres se ve también alterada (Guilherme *et al.*, 2008).

La RI se define como niveles normales o altos de insulina con respuesta biológica atenuada haciendo que las células beta del páncreas secreten más insulina provocando hiperinsulinemia y se da principalmente a nivel muscular reduciendo la formación de glucógeno y disminuyendo la oxidación de la glucosa (Shulman *et al.*, 1990). Los niveles elevados de insulina y la resistencia a la misma se dan por la desregulación de la hormona y por el exceso de carbohidratos consumidos lo que sobresatura la ruta glucolítica que da lugar a la formación de triglicéridos. (Nagle *et al.*, 2009).

Los fosfolípidos son otras sustancias lipídicas de gran importancia que se encuentran, en su mayoría formando las membranas celulares en donde gran parte de las funciones biológicas tiene lugar, regulando su permeabilidad, polaridad, solubilidad entre otras. También participan formando las vainas de mielina de las neuronas (Mead *et al.*, 1986), además son el principal componente de las lipoproteínas plasmáticas y el principal en circulación es la fosfatidilcolina sobre todo en VLDL y HDL. Los lípidos son sintetizados en hígado en el retículo endoplásmico de los hepatocitos (Fisher *et al.*, 2002).

El colesterol es utilizado en tres principales rutas metabólicas: en la formación de sales biliares, como sustrato para las enzimas formadoras de esteroides y hormonas relacionadas o bien como intercambiador de lipoproteínas HDL a VLDL, IDL y LDL para distribuirse a tejidos (Bale *et al.*, 1999).

Estos tres tipos de moléculas lipídicas: los fosfolípidos, triglicéridos y colesterol forman parte de lo que a nivel sérico se llaman lípidos totales lo cual se eleva cuando se presenta un desorden a nivel metabólico del organismo y con diverso significado clínico.

### **1.7 Hiperglucemia.**

La hiperglucemia generalmente es precedida por RI, se ha relacionado desde un inicio con el SM, el desarrollo de la obesidad y DMT2 (González *et al.*, 2017). Al sobrecargarse el hígado y los músculos de tejido adiposo se cargan principalmente de ácidos grasos libres no esterificados (NEFA), conduciendo a una producción elevada de glucosa hepática y RI propiciando efectos de SM a nivel periférico y cerebral debido a las alteraciones a nivel vascular y la función endotelial alterada (Mellendijk *et al.*, 2013).

La hiperglucemia está relacionada con la arterosclerosis principalmente por la glucosilación no enzimática de lípidos y proteínas, el estrés oxidativo y la inflamación metabólica provocando cambios bioquímicos en células endoteliales de los vasos cerebrales donde la glucosa es transportada desde la circulación a través del GLUT-1. La hiperglucemia induce a modificaciones bioquímicas presentes en diabetes (Mellendijk *et al.*, 2013).

### **1.8 Insulina y resistencia a la insulina (RI)**

En el SM la alta morbilidad está dada principalmente por el daño cardiovascular que sus patologías en conjunto producen, muchas de ellas están asociadas con la RI. En individuos sanos, la secreción de la insulina a nivel de los islotes es pulsátil y su liberación está dada por un patrón oscilatorio ultradiano y comienza a variar después de la ingesta de comida siendo el estímulo la glucosa. Su secreción inicial es rápida y le sigue otra de menor intensidad, pero más sostenida. La primera fase de la secreción es la porción de insulina ya sintetizada y almacenada en gránulos secretores mientras que la segunda es la insulina nuevamente sintetizada (Wilcox *et al.*, 2005).

La producción a nivel hepático de la glucosa tiende de los NEFA los cuales pueden derivarse a partir del exceso de carbohidratos y esto no solo altera los niveles de glucosa sino que también reduce la sensibilidad periférica de la insulina y por lo tanto modifica la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS por sus siglas en inglés) así que, al elevarse de forma aguda los NEFA, también se elevara la GSIS a nivel plasmático y la elevación crónica de NEFA provoca un descenso de GSIS y una síntesis insulínica reducida (Almanza *et al.*, 2008).

La insulina tiene acción a nivel celular que incluye el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, así como la transcripción y traducción de ARNm. En el metabolismo de carbohidratos su acción se produce en varias etapas, logrando una difusión facilitada de la glucosa en células lipídicas y musculares mediante el uso de los diversos GLUT según sea el caso, provocando un aumento de síntesis o degradación de glucógeno (Wilcox *et al.*, 2005).

Para el metabolismo lipídico la insulina estimula la síntesis de ácidos grasos en los adipocitos, el hígado y las glándulas mamarias en periodo de lactancia y a tiempo, la síntesis y el resguardo de triglicéridos en el tejido adipocitario y hepático. La insulina influye también en el metabolismo de los fosfolípidos. En cuanto al metabolismo proteico la insulina tiene efecto en gran cantidad de tejidos a nivel de la transcripción de ARNm en proteínas a nivel ribosomal (Kohsaka *et al.*, 2006).

Todo esto explica por qué la insulina es una hormona que regula distintas actividades en el abastecimiento energético a nivel celular y en el equilibrio de macronutrientes guiando los procesos anabólicos de la alimentación. Su papel principal es el transporte intracelular de la glucosa a los tejidos que son dependientes promoviendo así la síntesis de glucógeno y lípidos en células musculares y suprimiendo a su vez la lipólisis y la gluconeogénesis de los aminoácidos musculares, si hay un suministro adecuado de aminoácidos a nivel muscular la insulina es anabólica (Wilcox *et al.*, 2005).

### **1.8.1 ¿Cómo se provoca la resistencia a la insulina?**

La acción de la insulina se encuentra mediada por otras hormonas, entre ellas la hormona del crecimiento que se expone en respuesta a la insulina provocando hipoglucemia insulínica, entre las hormonas contra reguladoras se encuentra el glucagón, los glucocorticoides y las catecolaminas, hormonas que estimulan los procesos metabólicos en ayuno, si son expulsadas en exceso se podría provocar resistencia a la insulina según el entorno clínico del paciente y de los órganos dependientes afectados. Los principales tejidos dependientes de insulina son el tejido adiposo y el muscular (Wilcox *et al.*, 2005).

En el músculo la captación de glucosa se da principalmente por el GLUT-4 y absorbe del 60 al 70% de insulina en todo el cuerpo, promoviendo la síntesis de glucógeno permitiendo que la energía sea liberada de manera anaeróbica por medio de la glucólisis. En inanición la síntesis proteica llega a disminuir hasta en un 50% (González *et al.*, 2017).

El tejido adiposo, en estado postprandial el transporte intracelular de la glucosa también es insulino dependiente mediado por GLUT-4 y que este tejido capta aproximadamente un 10% de la insulina que estimula la captación total de la glucosa, al estimular la captación de glucosa, promover la y suprimir la lipólisis, también se limita el flujo de ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo (González *et al.*, 2017).

La obtención energética en estado basal puede ser suministrada por oxidación de ácidos grasos en estados bajas de insulina mientras que se liberan ácidos grasos libres a circulación para ser utilizados directamente por otros órganos donde posteriormente pasarán a ser cuerpos cetónicos brindando energía alternativa a órganos como el hígado o el corazón en caso de inanición prolongada (Lovic *et al.*, 2017).

Cuando hay RI en el hígado aumenta el flujo de ácidos grasos libres aumentando la producción de VLDL, mientras que la producción de cuerpos cetónicos se reprime debido a una hiperinsulinemia compensatoria, en cuanto a la lipasa, al ser dependiente de insulina disminuye la captación de triglicéridos a nivel periférico a partir de VLDL lo que contribuye a una hipertrigliceridemia. En este estado el tejido adiposo también secreta una elevada cantidad de citocinas con efectos sistémicos en la RI deteriorando la señalización de la insulina, lipólisis y la función del endotelio (González *et al.*, 2017).

El papel del hígado es fundamental debido a que aun cuando su captación de glucosa no es dependiente de insulina, aproximadamente el 30% de la eliminación de la glucosa si es mediada por la hormona lo que la hace necesaria para facilitar los procesos metabólicos clave. El incremento de ácidos grasos libres y la disminución a nivel adipocito del catabolismo de VLDL por RI promueve una respuesta pro-inflamatoria derivada de tejido adiposo (González *et al.*, 2017).

Otra de las respuestas desencadenada de las alteraciones es la disfunción endotelial debido a que las células endoteliales secretan factores implicados en el tono del vaso, función plaquetaria y por lo tanto en la coagulación y fibrinólisis, provocando un sinnúmero de problemas cuando se altera (Mederos *et al.*, 2016).

El síndrome de RI se caracteriza por un conjunto de anormalidades que incluyen intolerancia a la glucosa, dislipidemia, disfunción endotelial y un estado protrombótico, lo que produce una alteración hemodinámica en el individuo

haciendo que se eleve también el estado inflamatorio entre otros padecimientos, entre las enfermedades implicadas se encuentra la DMT2, ECV, SM, hipertensión esencial, SOP y otras (Bello *et al.*, 2012).

### **1.19 Alteraciones en la regulación bioquímica de la dieta y sus implicaciones fisiológicas.**

Si incrementa el consumo de carbohidratos y la síntesis de ácidos grasos, estos siguen la vía secretora en forma de triacilgliceroles y son transportados fuera del hígado en forma de VLDL que son hidrolizadas por la lipoprotein lipasa (LPL) en diversos tejidos, principalmente el adiposo provocando su liberación nuevamente en forma de ácidos grasos (Holvoet *et al.*, 2008). Cuando las VLDL ya liberaron los triglicéridos que contenían pasan a ser lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y continúan su trayecto a nivel circulación para seguir perdiendo triglicéridos y ganando colesterol esterificado (CE) de las HDL hasta que se convierten en LDL (Guilherme *et al.*, 2008).

En RI y SM las VLDL transportan el exceso de energía fuera del hígado lo que provoca que la producción de estos sea un indicador de una dieta hipercalórica, también disminuye la actividad de LPL en musculo esquelético lo que da lugar a una desregulación y conjunto de alteraciones que concluyen en una baja en el aclaramiento de las VLDL que irán a parar al plasma (Miyashita *et al.*, 2002). Al aumentar las LDL y disminuir la acción de la insulina en diversos tejidos repercute en receptores LDLR y LRP lo que también puede aumentar la lipemia postprandial, una característica importante del SM (Rotulo *et al.*, 2002).

En SM también se incrementa la actividad de HL y CETP lo que explica que el proceso sea altamente aterogénico por la alta susceptibilidad a que las moléculas sean oxidadas o bien glicadas en concentraciones elevadas de glucosa sérica (Lund *et al.*, 1998). Esto explica por qué la relación entre el incremento de LDL plasmáticas principalmente las cortas, densas y oxidadas y el aumento de insulina en circulación es un marcador incuestionable de RI sin importar el tipo de población en conjunto

con la disminución de las HDL. Existen diversas teorías por las que las HDL se ven disminuidas, la más aceptada es la formación de partículas pequeñas y densas LDL que da lugar a la formación de partículas pequeñas y densas de HDL las cuales son menos estables y fáciles de depurar a nivel renal provocando que las que retornan al hígado sean limitadas y su síntesis disminuya paulatinamente. En la mayoría de los análisis se han presentado evidencias de que existe una relación inversa entre la concentración de VLDL y HDL (Rotulo *et al.*, 2002).

Los AGL también están involucrados en el proceso de RI tanto a nivel muscular como a nivel hepático y a tiempo se relaciona con otros factores de riesgo cardiovascular incluidas las dislipidemias, hipertensión arterial y la hiperuricemia así como con la disminución de la función de las células beta. Se ha incrementado la relación entre los AGL, el aumento a nivel muscular de grasas intramiofibrilares y la RI afirmando que existe un fallo en la supresión de la lipólisis que en un estado fisiológico normal se produce con la actividad de la insulina (Bays *et al.*, 2004; Reaven *et al.*, 1995).

Bajo este criterio, la alteración de los niveles séricos de AGL se considera un factor importante en la etiología del SM y RI debido a que el ciclo entre la glucosa y los ácidos grasos se encuentra unido al metabolismo glucídico y lipídico. La oxidación lipídica en ayunas aunado a un bajo nivel de insulina sirve además de aportar energía para disminuir la captación a nivel muscular de glucosa y mantener estables los niveles glucémicos principalmente para proveer energía a nivel cerebral. Cuando el organismo no está en ayunas y se comienza a elevar el nivel sérico de insulina estimulando el depósito de glucosa a nivel hepático e inhibiendo la lipólisis haciendo que la fuente de energía sean los carbohidratos y no los lípidos. (Randle *et al.*, 1963).

La acumulación ectópica de lípidos en hígado y musculo provocando lipotoxicidad y alteraciones en las funciones de las células beta del páncreas. (DeFronzo *et al.*, 2004).

A nivel metabólico las dislipidemias se encuentran asociadas a alteraciones que involucran el transporte y manejo celular, sobretodo en la ingesta y el gasto calórico que es la limitante de la descompensación observada de forma hormonal principalmente de insulina y leptina lo que a su vez altera la homeóstasis celular, causando un incremento en el consumo calórico, en el desorden metabólico y mayor resistencia a la influencia hormonal provocando que se secrete cada vez más de las mismas lo que con el tiempo aumenta también los lípidos circulantes (Unger *et al.*, 2001).

El estado lipolítico está regulado por diversos supresores lipolíticos y se potencializa debido a la alteración que provoca la insulina en la señalización de los adipocitos afectando directamente a la regulación de la homeostasis de la glucosa (Albu *et al.*, 1999). Las alteraciones metabólicas y en general, el SM están íntimamente ligados al exceso de tejido adiposo, el cual puede ser manifestado de diversas maneras o incluso pasar desapercibidas de forma superficial, sin embargo las alteraciones tanto metabólicas como en la señalización hay alteraciones importantes (Rask *et al.*, 2012). La distrofia lipídica incorpora gran cantidad de estados fisiopatológicos en los que se encuentran implicadas las complicaciones metabólicas ya mencionadas. La comprensión de esta patología se resume en que el tejido adiposo, además de cubrir los requerimientos energéticos, también resguarda en exceso lípidos, principalmente triglicéridos (Blüher *et al.*, 2002).

Cuando hay un exceso de grasa peri visceral y/o intra abdominal con una actividad muy elevada de lipólisis se produce una superabundancia de AGL que por vía porta llega a nivel hepático, esto desencadenaría tres principales sucesos: un incremento de gluconeogénesis hepática, aumento de producción de VLDL saturadas de triglicéridos provocando termogénesis y una disminución importante del aclaramiento de insulina. Todo esto provoca hipertrofia e hiperplasia lipídica (Arner *et al.*, 2010). Todo esto se resume en que la grasa visceral es la que influye mayormente en la producción de señales pro-inflamatorias según los hallazgos en modelos animales con obesidad central, lo que puede ser descartado al mejorar la dieta, aumentar la actividad física, o bien mediante la administración de diversos

fármacos contrarrestando muchas de las afecciones implicadas (Trayhurn et al., 2005). Al trasladar esta situación a humanos, se ha encontrado que en adultos y jóvenes con sobrepeso se presentan alterados los mismos factores pro-inflamatorios, hipertróficos e hiperplásicos, y al eliminar el sobrepeso los pacientes muestran mejoría clínica importante (Florez et al., 2006).

### **1.10 Obesidad abdominal, SM y su relación con vascularización cerebral.**

La importancia del tejido adiposo parte del tejido adiposo blanco el cual desata importantes señalizaciones endocrinas, paracrinas y autocrinas. Las células adiposas liberan adipocinas que tienen un papel importante en la regulación metabólica y homeostática tanto a nivel periférico como central debido a que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), ya que intervienen a nivel endotelial, su desbalance afecta directamente su función lo que propicia la hipertensión y trombosis a través del inactivador de plasminógeno 1 (PAI-1), es probable que las adipocinas también estén involucradas en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas a nivel de la BHE, además también secretan adiponectina que afecta directamente a IL-6 en células endoteliales, potenciando la oxidación lipídica y tiene propiedades vasodilatadoras, lo que afecta también la disfunción endotelial. El nivel plasmático de adiponectina se encuentra estrictamente relacionado con obesidad y por ende con cada componente del SM. Por lo tanto, la obesidad tiene una importante relación con la desregulación del proceso pro y anti inflamatorio local y sistémico lo que eventualmente propicia mayor comorbilidad relacionada con ECV, otras anomalías metabólicas y trastornos neurológico (Mederos et al., 2016).

La inflamación crónica por obesidad, se debe a que el tejido adiposo blanco libera adipocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 y proteína C reactiva (PCR), aunado al incremento de macrófagos y adipocitos diferenciados a macrófagos en tejido adiposo blanco, lo que propicia la producción local de citocinas proinflamatorias y exacerba la actividad metabólica de este tejido. Esta condición evoluciona debido a la ingesta excesiva de nutrientes lo que tiene que ver con el desarrollo de RI y predice el desarrollo de SM y DMT2 (Mellendijk et al., 2013).

La RI también promueve la inflamación aumentando la concentración de AGL e interfiriendo con la respuesta antiinflamatoria temprana de la insulina resultando en inflamación y alteraciones en la homeostasis vascular desequilibrando también la vía del óxido nítrico y la acción de la endotelina-1. La obesidad se caracteriza por una alteración de la función microvascular en la que intervienen los niveles de AGL y glucosa en sangre, así como la liberación descontrolada de adipocinas, contribuyendo al desarrollo de microangiopatía y RI (Mellendijk *et al.*, 2013).

### **1.11 Relación entre SM y cerebro.**

El estudio del SM ha tomado demasiada importancia debido a que afecta no solo a la circulación periférica, sino también guarda un alto impacto en la vascularización y en la morfología cerebral por lo tanto se ve estrechamente relacionado con ECV, deterioro cognitivo, demencia y otras consecuencias a nivel cerebral (Mellendijk *et al.*, 2013).

Entre los eventos relacionados con intermediarios con el SM y el daño cerebral se encuentra el estrés oxidativo, así como el flujo sanguíneo cerebral (FC) el cual se relaciona íntimamente con cada uno de los factores del SM y que se ve afectado debido a que las grandes arterias cerebrales poseen una parte significativa de la resistencia cerebrovascular (RCV) lo que afecta la regulación sanguínea del FC y la determinación de la presión microvascular local. Los cambios microcirculatorios influyen tanto en la morfología como en la función de los vasos mayores provocando alteraciones al FC. Afectando a nivel neurológico debido a que el endotelio vascular interactúa de manera intrínseca con componentes de la unidad neurovascular como lo son neuronas, astrocitos, pericitos y células gliales. El daño a la vascularización cerebral se da mediante diferentes mecanismos interrelacionados que van desde la formación de placas ateroscleróticas y procesos inflamatorios que gradualmente encaminan a la alteración de la unidad neurovascular (Arriola *et al.*, 2017).

Otro de los factores del SM relacionados con el daño neurológico específicamente con el deterioro cognitivo y la demencia es la obesidad, a tiempo con la hipertensión a mediana edad principalmente y la diabetes en sus distintas fases ya que en todas ellas la vascularización y el FC se ven alteradas lo que conlleva al daño neuronal (Mellendijk *et al.*, 2013).

Los desequilibrios metabólicos son considerados riesgos para la integridad y la función de la BHE la cual se compone por células endoteliales especializadas afianzadas con pericitos, extremos de astrocitos y matriz extracelular en conjunto controlan el intercambio de una zona a otra manteniendo el equilibrio, el cual cuando se ve afectado influye directamente en el funcionamiento cerebral (Mellendijk *et al.*, 2013).

### **1.12 Relación SM, circulación cerebral y cognición.**

El cerebro depende del flujo sanguíneo para desarrollar de forma adecuada su función. En el SM, el flujo sanguíneo juega un papel importante en el deterioro cognitivo ya que su disminución se asocia con demencia y otros deterioros cognitivos a futuro. Las alteraciones a nivel vascular ocasionan microhemorragias cerebrales, lesiones en materia blanca (LMA) y materia gris y atrofia cerebral. (Mellendijk *et al.*, 2013).

Esto, ocasiona la disminución de volumen cerebral. Se ha demostrado que el SM ocasiona un rendimiento cognitivo menor que los individuos sanos. Afectando principalmente la velocidad de procesamiento de información, atención y función ejecutiva. Otros estudios han mostrado una baja en la fluidez verbal en un lapso de 14 años y disminución en el funcionamiento cognitivo global en un periodo de 3 años, ambos cambios podrían ser el resultado de una falta de integridad microestructural del tejido cerebral que se encuentra disminuida en individuos de mediana edad y ancianos con SM (Lueptow *et al.*, 2017).

Antes de la demencia, se presenta un deterioro cognitivo leve (DCL) el cual es una etapa intermedia de daño en la cual los cambios cognitivos que se dan en las etapas de envejecimiento normal y tiende a evolucionar a demencia. En diversos estudios se ha descrito la relación que tiene el SM con la progresión de DCL a demencia de forma significativa en 3.5 años, también se le ha asociado con la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras enfermedades neurodegenerativas (Akhlaq *et al.*, 2012).

La leptina tiene la capacidad de llegar al SNC a través del LCR y puede interactuar con áreas específicas del cerebro que incluyen al hipotálamo e hipocampo. En la obesidad los niveles de leptina incrementan lo que puede inducir resistencia a la misma, disminución de la respuesta y su disminución a nivel cerebral lo que repercute en la memoria y en general en la función cerebral ya que se encuentra relacionada con la neurogénesis, el crecimiento axonal, la neuroprotección de la sinaptogénesis y la mejora de la formación de la memoria en la región cerebral del hipocampo (Almanza *et al.*, 2008).

**Tabla 1. Descripción de los efectos inducidos por el SM en la vascularización y la circulación y sus efectos en la cognición.** Tomada y modificada de: Impact of Nutrition on Cerebral Circulation and Cognition in the Metabolic Syndrome (Mellendijk *et al.*, 2013).

| EFECTOS DEL SM EN LA VASCULATURA Y LA CIRCULACIÓN | EFECTOS DEL SM EN LA COGNICIÓN |
|---|--------------------------------|
| ↓densidad capilar                                 | ↓ Función de memoria inmediata |
| ↓ Respuesta de vasodilatación arterial cerebral   | ↓ inteligencia fluida          |

|   |  |
|---|--|
| ↓ Reclutamiento capilar   | ↓ Conocimiento global y en mujeres             |
| ↑ Espesor de los medios íntimos   | ↓ velocidad de procesamiento de la información |
| ↑ rigidez arterial  | ↓ Función ejecutiva y en masculino             |
| ↓ flujo sanguíneo cerebral (CBF) y en el hombre   | ↓ Atención                                     |
| ↑ Cantidad de aterosclerosis  | ↓ En rendimiento de recuperación               |
| ↓ Reactividad Vasomotora (VMR)  | ↓ Función vasoespacial                         |
| ↓ CBF en aspectos medial + lateral de la materia gris del lóbulo frontal y parietal (GM) y áreas laterales del lóbulo temporal y occipital GM | ↓ Función de memoria en hombre                 |

### 1.13 Implicación del SM a nivel cerebral

En los últimos años el estudio del SM a nivel central ha tomado importancia incluyendo circulación y su impacto en la cognición afectando a la vasculatura periférica y alterando de forma estructural y funcional la vasculatura cerebral, así como la resistencia, rigidez y remodelación afectando al cerebro de diferentes maneras. Todo a causa de alteraciones en la perfusión sanguínea a nivel cerebral, afectación en la autorregulación, anomalías en la reactividad vascular o bien en la producción y secreción desregulada de adipocinas periféricas. Todos estos factores pueden conducir a un mayor riesgo de desarrollar MCI, demencia y accidente cerebrovascular (Akhaq *et al.*, 2012).

Como se sabe, las enfermedades cerebrales afectan a personas de mayor edad y su prevalencia incrementa de manera exponencial conforme aumenta la edad. La demencia es de las enfermedades más comunes; la enfermedad de Alzheimer (EA)

y la demencia vascular (VaD) son de las formas más comunes de demencia (Panzaa *et al.*, 2010).

Existe gran evidencia de que el deterioro cognitivo leve (MCI por sus siglas en inglés) tiene una gran posibilidad de evolucionar a EA, sin embargo, no todos los pacientes con MCI en un futuro tendrán EA.

La vascularización y los factores vasculares tienen una gran asociación con estos padecimientos, entre ellos se incluye la hipertensión arterial, colesterol elevado y dislipidemias en general, DM y resistencia a la insulina, IMC elevado y obesidad, en general: todos los parámetros que incluye el SM los cuales están implicados en un ECV clínico e infarto silencioso en un promedio de 2 a 4 veces y entre más factores tenga el paciente mayor será su mortalidad. Todos estos factores aún de forma independiente son considerados de riesgo para enfermedad arterial coronaria (CAD) y ACV (González *et al.*, 2017).

Particularmente la tolerancia de glucosa y un ayuno prolongado están estrechamente relacionados con el deterioro en el rendimiento cognitivo lo que pone a la DMT2 como uno de los factores principales para generar demencia.

Entre los mecanismos de la DM para causar deterioro cognitivo se encuentran las complicaciones que la misma implica, como son enfermedad renal, apoplejía, hipertensión, hiperlipidemia, y enfermedad isquémica del corazón (Muñoz *et al.*, 2016).

La hiperglucemia crónica afecta directamente a nivel neuronal y también por la glicosilación avanzada de productos finales (AGEs) ya que una elevación de estos es una característica en pacientes con EA, lo cual puede relacionarse con la vía neurotóxica de amiloide, también por aterosclerosis cerebral y enfermedad cerebral microvascular. La insulina está relacionada de manera independiente con el deterioro cognitivo gracias al reciente descubrimiento de la enzima degradadora de insulina que también sirve como catalizador para el amiloide, disminuye su actividad en hiperinsulinemia y RI sobre todo en la región del hipocampo (Yaffe *et al.*, 2004).

El deterioro en la vascularización de debe en gran medida a la alteración de los niveles de mediadores vasoactivos como el óxido nítrico (NO), endotelina y por estrés oxidativo en general. Todas estas anomalías llevan a la alteración de la perfusión cerebral y conllevan al deterioro cognitivo. También se eleva el nivel de cortisol lo cual atrofia el cerebro a nivel del hipocampo alterando la función de aprendizaje y memoria. Debido a que HDL es el principal transportador de colesterol al cerebro y en las dislipidemias se encuentra disminuido puede propiciar fallo neuronal debido a que en niveles normales mejora la conectividad sináptica y regeneración, pero en disminución provoca un incremento de TNF-  $\alpha$  y formación de placas seniles (Muñoz *et al.*, 2016).

#### **1.14 El SM, estrés oxidativo y su relación con el deterioro cerebral**

Cuando se presentan todos los desórdenes que el SM implica; la inflamación incrementa de forma descontrolada, en donde el TNF- $\alpha$  promueve la generación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) mientras que el tejido adiposo secreta angiotensina II incrementando la actividad de NADPH como consecuencia incrementa el consumo de oxígeno y a su vez la producción de EROs entre ellos el radical hidroxilo (OH), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Si el contenido adiposo continúa incrementando el metabolismo de oxígeno también aumenta la oxidación de estos lo que afecta la estructura y función de las neuronas de la corteza temporal y el hipocampo (Treviño *et al.*, 2015).

Los reportes indican que una dieta hipercalórica provoca muerte neuronal por apoptosis a nivel de hipocampo. En donde se observa una mayor inmunorreactividad para la caspasa-3, la cual, es una proteína clave en la señalización apoptótica y se encuentran involucradas en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos por lo que son utilizadas como marcadores para evaluar la viabilidad de diversas células (Elinos *et al.*, 2001)

#### **1.15 El hipocampo y la memoria**

El sistema límbico se encuentra relacionado con procesos como la memoria, las emociones y la navegación espacial. Ahí se encuentra el hipocampo cuya principal

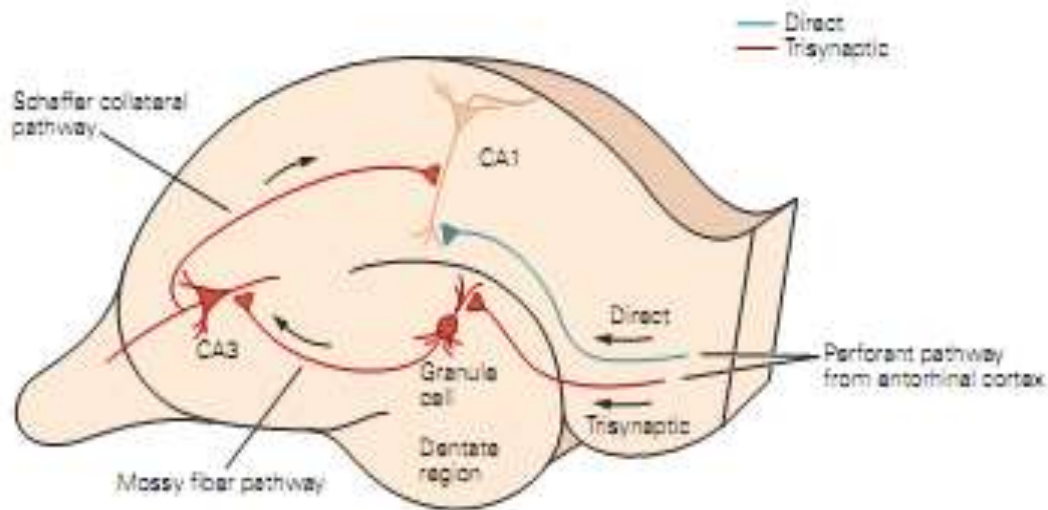
función es generar memorias y recuperar memorias a largo plazo gracias a que actúa como activador de distintos recuerdos distribuidos en el encéfalo. Es sabido que un daño a este nivel provocaría amnesia anterógrada y retrograda.

El aprendizaje se define como el proceso mediante el cual se adquieren nuevos conocimientos mediante el procesamiento de información que posteriormente será almacenada para ser recuperada en lo que conforma la memoria ya sea a corto o a largo plazo. Eso se define como el proceso mediante el cual la información es codificada, almacenada y consolidada (Aguirre *et al.*, 2015).

La información que fue sintetizada después de ser obtenida de forma visual, auditiva y somática, pasa de la parte prefrontal, límbica y parieto-occipito-temporal a la corteza para-hipocámpica, y luego a la corteza entorrinal, hipocampo, subículo y finalmente a la corteza entorrinal, después es devuelta a las áreas hasta llegar a las áreas asociadas a la neocorteza. La corteza entorrinal funciona como fuente aferente hacia el hipocampo y a su vez como vía de salida para el mismo. Esto explica porque una lesión en esta área alteraría la memoria (Aguirre *et al.*, 2015).

El hipocampo es una parte transitoria para la memoria a largo plazo ya que esta tiene lugar en áreas de asociación de la corteza cerebral. La consolidación es el proceso mediante al cual la memoria de corto plazo pasa a ser memoria de largo plazo y en el intervienen tres procesos: la expresión génica, síntesis de proteínas y crecimiento de conexiones sinápticas (Ortega *et al.*, 2010).

El almacenamiento de la memoria explícita es en el hipocampo también conocido como Cuerno de Amón (CA) y se caracteriza por la presencia de células piramidales. El hipocampo está dividido en cuatro regiones: CA1, CA2, CA3 y CA4 y recibe aferencias por tres vías principales a las cuales se les conoce como potenciación sináptica a largo plazo (Ortega *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Esquematación del hipocampo con sus tres vías aferentes, se muestra giro dentado y las partes CA1, CA2 y CA3. Tomada y modificada de Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. Plasticidad Neuronal. Ortega, 2010.

### 1.16 La Farmacoterapéutica para el SM

El pronóstico para el SM, DMT2 y ECV es favorable hasta en un 25% en los próximos años si es tratado en etapas tempranas por lo que su detección oportuna es de suma importancia a nivel mundial, tanto en el ámbito de salud como en el económico teniendo como objetivo una mejora en la calidad de vida mediante un estilo de vida saludable incluyendo dieta y ejercicio propiciando la reducción de peso y su mantenimiento para a largo plazo evitar la aparición de alguno de los componentes del SM (Hernández *et al.*, 2009).

Al ser el SM un conjunto de desórdenes, no existe un tratamiento en específico que trate todas las alteraciones que este incluye, en su lugar se trata a cada entidad por separado y la terapéutica del paciente dependerá según la clínica individualizando prioridades y estrategias de tratamiento.

La finalidad de dar un tratamiento para hipertensión arterial es mantener un umbral menor a 140/90 mmHg pero si el riesgo es mayor es decir, incluye otros padecimientos como riesgo cardiovascular y/o diabetes el valor del umbral esperado

disminuye. En 2007 la ESH/ESC considero como PAS normal 120-129mmHg PAD 80-84mmHg normal alta PAS130-139mmHg PAD 84-89mmHg hipertensión grado 1 PAS 140-159mmHg PAD 90-99mmHg, hipertensión grado 2 PAS 160-179mmHg PAD100-109mmHg (Lizarzaburu *et al.*, 2013).

Entre los antihipertensivos más usados se encuentran los bloqueadores del eje renina-angiotensina como lo inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II (ARA) que tiene una menor incidencia de diabetes favoreciendo de manera positiva en las lesiones de órganos blanco de pacientes diabéticos. En algunas ocasiones se adiciona un bloqueador de calcio o diurético tiazídico en pequeñas dosis para no interferir en el metabolismo glucolítico lo cual se atenúa manteniendo los niveles de potasio normal. En algunos casos es necesario adicionar espironolactona principalmente en el caso de personas obesas. Existe una controversia en cuanto al uso de beta-bloqueadores en pacientes con SM debido a la gran cantidad de efectos adversos que provocan, entre los más relevantes se encuentran incremento de peso, aumento de padecer diabetes, mayor desbalance lipídico y resistencia a la insulina.

Un buen manejo de hipertensión puede prevenir la aparición de demencia tanto en EA como en DVa y que un tratamiento con estatinas resulta tener efectos similares. Para tratar a pacientes con hiperglucemia en ayunas lo más usado son las sulfonilureas principalmente la metformina la cual frena el desarrollo de diabetes debido a su acción hipoglucemiante mediante la supresión de la gluconeogénesis hepática y por lo tanto de SM, además de que tiene otras ventajas como el tratamiento de Síndrome de Ovario Poliquístico. El uso de insulina inyectable disminuye la incidencia, pero no muestra diferencia en la morbilidad y mortalidad, P.A. o hemoglobina glicosilada. La rosiglitazona también disminuye el desarrollo de DM, pero su principal limitante radica en la retención de líquidos y el incremento de peso que produce. Según las guías 2007 de la ESH/ESC si la persona hipertensa tiene un riesgo muy elevado debe adicionar a su terapia ácido acetilsalicílico siempre y cuando no haya contraindicaciones a su uso como un riesgo de

hemorragia o alergia. La ADA también le ha sugerido como profiláctico en pacientes diabéticos mayores de 40 años con riesgo cardiovascular (Lizarzaburu *et al.*, 2013).

El uso de fármacos, como la Liraglutida que funciona como análogo del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) el cual hace más lento el vaciamiento gástrico, aumenta la sensibilidad a la insulina y por lo tanto reduce el apetito. Otro fármaco muy común en la terapéutica es el Orlistat el cual ayuda a la pérdida de peso evitando la absorción de nutrientes haciendo enlaces covalentes a nivel de las lipasas pancreática y gástrica impidiendo la hidrólisis de los triglicéridos por lo que los lípidos no son absorbidos y el balance energético se vuelve negativo (Mendevil *et al.*, 2005).

El Rimonabant es un antagonista selectivo del receptor cannabinoide-1, que inhibe la unión de endocannabinoides a nivel central y periférico, lo que incluye a los adipocitos, modificando el equilibrio energético, metabolismo de glucosa y en neuronas del sistema mesolímbico modulando la ingesta de dulces y grasas principalmente, pero ha sido cancelado en países como España debido a las alteraciones psiquiátricas que implica, principalmente trastornos depresivos (Salem *et al.*, 2012).

### **1.17 Otras estrategias de intervención para el SM**

El SM se puede controlar al modificar de forma saludable el estilo de vida, reducir el peso e incrementar la actividad física ya que no solo corrige el factor de riesgo cardiovascular, sino que a su vez previene el desarrollo de diabetes lo que trataría los riesgos mayores del SM y mejora la sensibilidad a la insulina, el control glicémico y propicia el incremento de HDL. Acompañado de conductas saludables como evitar el consumo de alcohol, tabaco (Mendevil *et al.*, 2005).

Estudios clínicos de gran escala demuestran que aproximadamente el 58% de los casos redujeron en la progresión de intolerancia a la glucosa en casos de DMT2 modificando de forma intensiva el estilo de vida con alrededor de 25 minutos de

ejercicio al día para mejorar la captación de glucosa dependiente de insulina. La finalidad de modificar la dieta es ayudar a reducir la ingesta de energía y aumentar la actividad física propiciando la desaparición o reducción de la gravedad de uno o más factores relacionados con el SM y esto solo se logra al mantener una dieta constante y que esta no represente algún tipo de riesgo para el resto de los factores.

La pérdida de peso debe no debe ser mayor al 7-10% en 6-12 meses y esta debe ser con dieta balanceada y debe ir acompañada de ejercicio, se ha demostrado que las dietas hipocalóricas o híper-hidrocarbonadas brindan buenos resultados. Se cree que modificar el estilo de vida trae más beneficios y menos riesgos que el administrar fármacos y si es a edad temprana los resultados son mejores. Han sido propuestas diversas alternativas desde integrales hasta suplementos con mono, oligo o multielementos, entre estos destacan los fitoestrógenos, magnesio, vitamina A y C y ácidos grasos poliinsaturados como el omega 3 y flavonoides y una dieta mediterránea (Figueira *et al.*, 2012).

El tipo de dieta influye en el metabolismo de lípidos y que a su vez están relacionados con el metabolismo de carbohidratos por lo que una dieta alta en alguno de estos afectara directamente a los demás, cuando se reemplazan dietas altas en carbohidratos por dietas con alto contenido de grasas mono insaturadas los niveles plasmáticos de triglicéridos bajan. Las dietas bajas en carbohidratos también disminuyen la producción de lipoproteínas de baja densidad (VLDL). (Mellendijk *et al.*, 2013).

La cognición tiende del tipo y la calidad de grasa que se ingiere más allá del total de la ingesta de grasas, un alto consumo de ácidos grasos saturados (SFA) se relaciona con una función cognitiva baja, alteraciones en la memoria prospectiva, velocidad de la memoria y flexibilidad y por lo tanto vulnera a enfermedades neurológicas, mientras que el alto consumo de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se asocian con un mejor rendimiento cognitivo. El consumo de carbohidratos con bajo índice glucémico (GI)

y alto contenido de fibra mejora el control glucémico y lipídico mientras que los carbohidratos con alto GI aumentan las concentraciones de triglicéridos y disminución de HDL, lo que comprueba que la ingesta de fibra beneficia la salud metabólica debido a su contenido de polisacáridos indigeribles además de que transporta y protege gran cantidad de micronutrientes destinados a la microbiota ayudándoles a producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) promoviendo el gasto de energía, protegiendo de la inflamación y la RI (Ferruzzi *et al.*, 2009).

Los beneficios se atribuyen en gran medida a que este tipo de dietas incluye la ingesta de frutas y verduras con alto contenido de antioxidantes, vitaminas y minerales. Además incluyen pescado, semillas, cereales, nueces y demás que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados y fibras solubles así como en polifenoles que son neuroprotectores, lo que también se asocia con una mejor función cognitiva en general, mejoría visual, atención y funciones ejecutivas en personas de la tercera edad con riesgo de SM. También se ha sugerido la reducción de sodio con un aumento de potasio para la prevención y el tratamiento de hipertensión ya que el potasio posee efectos positivos en la regulación de hipertensión y con una menor incidencia de accidentes cardiovasculares y cerebrovasculares, DMT2, hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca y arritmias (Valenzuela *et al.*, 2007).

La dieta afecta directamente a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en plasma debido a que los carbohidratos dietéticos son el precursor principal de la glucosa plasmática por lo que a mayor ingesta mayor nivel de glucosa en sangre principalmente postprandial lo que representa un factor crítico en la liberación de insulina, por lo tanto la reducción de carbohidratos en la dieta limita el nivel de glucosa en sangre beneficiando el control glucémico y los niveles de insulina. Esto también depende de la fuente y la calidad de los carbohidratos lo cual se ve directamente relacionado con el grado de RI, es decir, los alimentos con alto IG aumentan la RI mientras que los de alto contenido de fibra dietética total es decir, los poco procesados disminuyen la RI (Mellendejik *et al.*, 2013).

### **1.18 Uso de antioxidantes como método alternativo al tratamiento contra el daño que produce el SM.**

En la actualidad se ha estudiado el uso de antioxidantes como una alternativa terapéutica para enfermedades en donde el estrés oxidativo y la inflamación juega un papel importante, como es el caso del SM. Estos controlan los niveles de glucosa y la regulación de insulina, ayudan a disminuir el proceso de inflamación, además tienen un efecto neuroprotector al disminuir la inflamación a nivel central, mejoran el flujo sanguíneo cerebral, repara el daño en el endotelio y protegen de manera directa las células cerebrales (Farbood *et al.*, 2013).

### **1.19 Flavonoides.**

Los flavonoides son compuestos fitoquímicos con estructura polifenólica que representan constituyentes esenciales de la parte no energética de la dieta humana. Gracias al aumento de defensas antioxidantes endógenas el estado redox se mantiene equilibrado, entre los principales sistemas antioxidantes endógenos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión peroxidasa (GPx), que son esenciales para la desintoxicación de los peróxidos lipídicos. Estudios como el de Kerber y colaboradores en 2011 en su estudio con quercetina, refuerzan la información que existía previamente a cerca de que los flavonoides son potentes removedores de radicales libres como los aniones superóxido y los radicales hidroxilos esto gracias a que los flavonoides tienen una actividad SOD similar a la del grupo CO (Kerber *et al.*, 2013).

El uso de polifenoles también mejora las lesiones de excitotoxicidad e inflamatorias mediante la regulación de la ruta NF- $\kappa$ B esto gracias a la teoría de que los derivados de los polifenoles son capaces de atravesar la BHE lo que les permite llegar a las células cerebrales, modulando la inflamación mediada por microglia ejerciendo efectos neuroprotectores propiciando una mejora en pacientes con enfermedades neurodegenerativas previniendo los trastornos degenerativos y el deterioro cognitivo(Farbood *et al.*, 2013).

Pese al gran número de beneficios que los polifenoles ocasionan, su mecanismo de acción no se ha dilucidado por completo, se sugiere que va desde efectos periféricos como la potenciación del flujo sanguíneo cerebral hasta la activación de receptores como las neurotrofinas y la modulación de señales.

Los metabolitos de los polifenoles que se encuentran en circulación son lo que se obtiene como resultado de una gran conjugación que se da gracias a la digestión, metabolismo hepático y a nivel del colón y se muestra una diferencia significativa del compuesto nativo y la concentración administrada es mucho mayor que la concentración de los metabolitos circulantes biodisponibles. Gracias a la absorción intestinal, los metabolitos de los polifenoles pasan a circulación lo que les permite tener acciones *in vivo* y como se ha comprobado que son capaces de atravesar la BHE pueden actuar de forma directa a nivel neurológico (Daskalova *et al.*, 2015)

Pese a que los polifenoles obtenidos por la dieta presentan una gran actividad neuroprotectora, su permeabilidad selectiva a nivel de la BHE, su absorción deficiente, el rápido metabolismo y su eliminación sistémica limitan su biodisponibilidad para ejercer con mayor eficacia el efecto esperado. Los metabolitos tienen mayor permeabilidad dependiendo del polifenol inicial del que se trate, se sugiere que las diferencias en el transporte endotelial de los metabolitos están relacionadas con el grado de modificación química, en el caso del ácido gálico y derivados del catecol la metilación y sulfatación les beneficia en el transporte, pero no funciona con los demás polifenoles (Kerber *et al.*, 2013).

En un estudio en 2018 se trataron células con peróxido de hidrógeno como desafiante y se demostró que los metabolitos de los polifenoles tienen un efecto citoprotector en células de la BHE evitando el daño oxidativo. Los principales polifenoles dietéticos que inhiben las vías de señalización relacionadas con la súper activación de la microglia son la quercetina, curcumina y resveratrol (Knasmuller *et al.*, 2018)

### **1.20 Efecto del ácido gálico como protector neuronal y antioxidante sistémico.**

El ácido gálico (AG) es un compuesto polifenólico natural de peso molecular pequeño que se encuentra en plantas como el zumaque, hamamelis, hojas de té, corteza de roble y otros compuestos vegetales. En la naturaleza sus metabolitos se encuentran en dos formas principales: en forma de ácido gálico metilado y como conjugado de galloil de catequina. Comúnmente es utilizado a nivel industrial en la fabricación de colorantes, curtido de cuero y demás actividades (Knasmüller *et al.*, 2018).

A nivel biológico tiene una función muy importante como antioxidante y eliminador de radicales libres, antiinflamatorio, antimicrobiano antiapoptótico e incluso anticancerígeno. El AG posee una elevada actividad anti-tirosina, lo que le brinda capacidad antioxidante y disminuye la inflamación a nivel cerebral lo que se ha demostrado en ratas con hipoperfusión (Knasmüller *et al.*, 2018).

En ratas con isquemia cerebral inducida, el ácido gálico resulta ser más efectivo que la fenitoina como fármaco utilizado, además, el tratamiento con AG evita significativamente el daño neuronal tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo. También protege de manera significativa al cerebro del deterioro que causa la hipoperfusión cerebral crónica que es común en las ECNT y por lo tanto en el SM que provocan trastornos neurodegenerativos y daño neuronal en general que ocurre de forma común en humanos adultos (Sarkaki *et al.*, 2018).

Existen hipótesis de que el efecto neuroprotector del ácido gálico se debe a que inhibe la señalización del receptor NMDA y de esta forma prevenir la muerte neuronal (Sarkaki *et al.*, 2018).

## **2.0 JUSTIFICACIÓN.**

El SM es un grupo de diversas patologías interrelacionadas entre sí, es además una de las afectaciones clínicas con mayor relevancia debido a su alta incidencia a nivel mundial y un gran porcentaje de casos son de la población mexicana. Como ya se definió, el SM incluye sobrepeso, DMT2, HA, dislipidemia y RI condicionando gravemente el estado de salud del paciente.

Se debe tener en cuenta que el SM es una combinación de factores genéticos y sobretodo de los hábitos individuales entre los que destacan la mala alimentación, sedentarismo, exceso en la ingesta de calorías y falta de apego a los tratamientos favoreciendo el desarrollo de la enfermedad. Es muy común que estos casos se den en países en vías de desarrollo debido a la calidad de vida que tiene la mayoría de su población incluido México, y su alta incidencia hace que el análisis de estas patologías sea estudiado a fondo en busca de una solución viable a corto y largo plazo.

Gracias a la facilidad que hay actualmente de reproducir el trastorno con el uso de dietas hiperglúcidas e hipercalóricas es posible evaluar los daños que implica en diversos tejidos de modelos incluidos los modelos murínicos. También permite observar la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, y sobre todo el daño neuronal que a su vez provoca déficit en todos los demás procesos que le incluyen.

Actualmente existen diversos estudios que dan una orientación sobre el origen de los desórdenes metabólicos y su relación con la parte neuronal pero pocos incluyen una combinación con dietas hiperglúcidas e hipercalóricas y que al mismo tiempo, permita desarrollar todas las características que implica el SM.

Si se cuenta con un modelo animal que tenga facilidad de reproducir el SM y a su vez con la dieta adecuada para desarrollarlo y así poder desenvolver los mecanismos implicados en los procesos degenerativos será posible proponer una alternativa terapéutica para contrarrestar el daño que produce a diversos niveles.

Al reproducir estas características es posible evaluar la efectividad de otra alternativa terapéutica menos invasiva como el AG en el tratamiento del SM y de

sus efectos negativos a nivel cerebral, debido a que se sabe que además de sus propiedades antiinflamatorias, sus metabolitos poseen una variedad de efectos benéficos sobre el organismo. La propiedad antioxidante se atribuye principalmente al potencial quelante que le confiere su estructura química, asociado con la reducción del riesgo de ciertas enfermedades crónicas y por lo tanto previniendo enfermedades crónicas e hiperplasia. Se ha comprobado que el AG mejora la expresión y la secreción de adiponectina mediante la diferenciación de adipocitos, lo que lo hace una buena opción terapéutica para prevenir y tratar a pacientes con SM.

En el estudio que se presenta en este trabajo se busca una alternativa terapéutica con ácido gálico para tratar el SM mediante el uso de roedores que previamente fueron inducidos a SM mediante el consumo de una dieta hipercalórica/hiperglúcida.

## **2 HIPÓTESIS.**

**H<sub>0</sub>:** El La administración de ácido gálico mejora la estructura y función de neuronas del hipocampo, lo cual contribuye a mejorar la memoria de reconocimiento en ratas con síndrome metabólico.

**H<sub>1</sub>:** La administración de ácido gálico no modifica la estructura y función de neuronas del hipocampo, por lo que la memoria de reconocimiento se deteriora de manera significativa en ratas con síndrome metabólico.

## **3 OBJETIVO.**

### **4.1 Objetivo general:**

Estudiar el efecto de la administración del ácido gálico sobre la estructura y función del hipocampo de ratas con síndrome metabólico y sus consecuencias sobre la memoria de reconocimiento

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Evaluar los cambios zoométricos y metabólicos que induce la administración del AG en ratas con SM.
- Identificar los cambios en la memoria de reconocimiento de ratas tratadas con AG bajo condiciones de SM.
- Analizar los marcadores celulares y tisulares de neurodegeneración en el hipocampo de ratas con SM y administradas con AG.

#### **4 METODOLOGÍA.**

Los murínos son un modelo idóneo para estudiar enfermedades metabólicas y a nivel central presentes en humanos. En particular la cepa Wistar es un modelo que emula las características químico biológicas y fisiológicas a nivel cerebral en los humanos.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad con un peso promedio de 80 a 120g, obtenidos en el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla donde les fueron brindadas todas las condiciones adecuadas para su desarrollo normal en cajas adaptadas con una cama de aserrín, sin alterar sus ciclos normales de luz-obscuridad 12x12h, con una temperatura de 24°C, con acceso libre a agua y alimento y una humedad del 50%.

Todos los procedimientos de manejo, cirugía y disección de los animales, fueron sujetos a los protocolos aprobados por los comités nacionales (NOM-062-ZOO-1999) sobre el manejo y el uso de animales de laboratorio. Se empleó un número mínimo de animales de acuerdo a las necesidades que requiere un estudio estadístico para la descripción de poblaciones, el cual resultó en una n=20 por grupo.

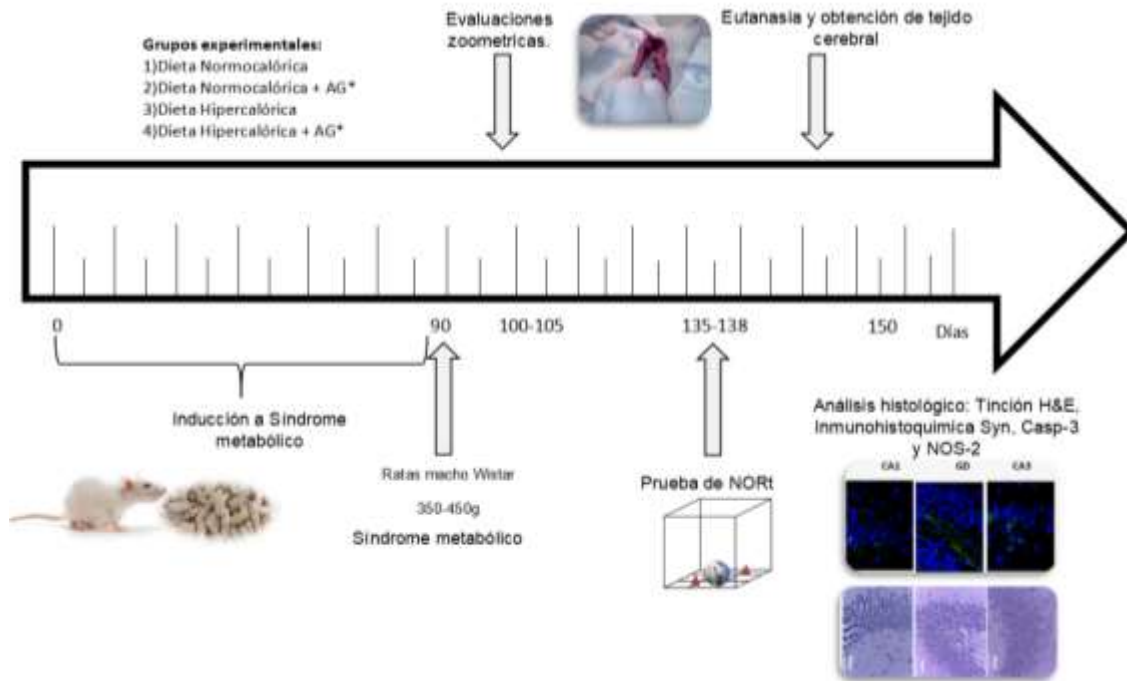
Se formaron dos grupos: control (n=10) y problema (n=10). El grupo control se mantuvo con dieta balanceada de aporte energético de 4.87g de carbohidratos que se describe en la tabla 2, y el grupo problema se expuso a una dieta con aporte energético de 7.14g de carbohidratos (dieta hipercalórica/ hiperglúcida) descrita en la tabla 3, durante 90 días, tiempo necesario para inducir el síndrome metabólico.

**Tabla 2.** Descripción de la dieta normocalórica brindada a los animales del grupo control por el personal del bioterio.

| Dieta balanceada para animales de laboratorio LabDiet 5001 (10G) |               |       |
|--|---------------|-------|
| Cantidad en gramos (g)   | Aporte        | Kcal  |
| 4.87   | carbohidratos | 19.48 |
| 2.39   | proteínas     | 9.56  |
| 0.5  | lípidos       | 4.5   |
| 0.51   | fibra         | 1.0   |
| 0.7  | cenizas       | --    |
| Total  |               | 34.54 |

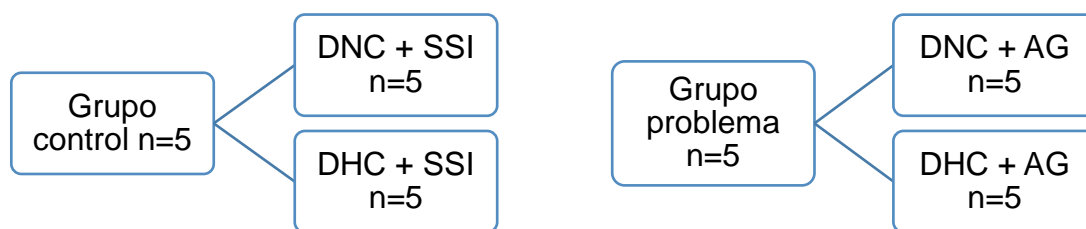
**Tabla 3.** Dieta hipercalórica/hiperglúcida con registro de patente (MX/E/2013/047377) brindada a los grupos problema durante 90 días para inducir el SM.

| Dieta hipercalórica/hiperglúcida inductora de SM (10g) |               |       |
|--|---------------|-------|
| Cantidad en gramos (g)                                 | Aporte        | Kcal  |
| 7.14   | carbohidratos | 28.6  |
| 0.73   | proteínas     | 2.92  |
| 0.58   | lípidos       | 5.22  |
| 0.0  | fibra         | 0.0   |
| 0.35   | cenizas       | --    |
| total  |               | 36.74 |



**Figura 2.** Diagrama de trabajo. Se describe la cantidad de días y el tipo de tratamiento brindado a cada grupo experimental, el tipo de prueba y examen al que se sometieron y los resultados que se obtuvieron.

Una vez generado el síndrome metabólico, los animales del grupo control (n=10) y problema (n=10) se dividieron en dos sub-grupos:



**Figura 3. Distribución de los sujetos de estudio.** Se muestran los cuatro grupos en los que se dividieron para poder realizar el experimento.

La preparación del AG se realizó en una campana de flujo laminar empleando agua destilada, con ayuda de guantes, bata y cubre bocas. El ácido gálico, de acuerdo a su hoja de seguridad de AMSA (107761-42-2), es un medicamento no peligroso y todos los residuos y material empleado durante su preparación fueron desechados dando cumplimiento a las normas de RPBI y control de medicamentos. Este medicamento, no representa un riesgo para el personal que labora en el Bioterio.

El AG a dosis de 200mg/kg se administró por vía oral de forma diaria durante 60 días con ayuda de una cánula de calibre necesario para minimizar los riesgos de algún daño en los animales. A los grupos control de las administró SSI en los mismos volúmenes equivalentes.

Para determinar los parámetros zoométricos los animales fueron medidos cada semana de manera individual. Para determinar el peso se utilizó una balanza digital previamente tarada con una caja de policarbonato y una cama delgada de aserrín, para obtener la talla se midió con una cinta métrica flexible desde la punta de la nariz hasta la punta de la cola, mientras que el perímetro abdominal se midió con la misma cinta métrica flexible colocada a la altura de la parte posterior del diafragma. Una vez obtenidos estos datos se calculó el índice de masa corporal para determinar el rango de obesidad en el que se encontraban los sujetos, el índice de Lee para calcular el riesgo cardíaco, el índice aterogénico para saber la posibilidad de padecer aterosclerosis y índice Homa-IR para determinar la resistencia a la insulina, utilizando las siguientes formulas.

### **5.1 Pruebas conductuales (prueba de NORt).**

El tratamiento con el AG tuvo una duración de 60 días de administración, al día 61 se realizó la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORt), dicha prueba consiste en una evaluación cognitiva en donde el objetivo es la evaluación de la capacidad para recordar características físicas de los objetos utilizados tales como forma, ubicación y textura (Ennanceur *et al.*, 1991; Carlini *et al.*, 2011).

Antes de iniciar el proceso los animales fueron sometidos a un proceso de habituación en el área de prueba, la cual se realiza en tres fases:

La prueba se realiza en una habitación con luz roja con la ayuda de una caja de campo abierto (60cmx60cmx50cm) dentro de la cual se coloca al animal para comenzar la prueba. Esta prueba consta de 3 fases:

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

Fase 2 (Día 2 post-administración de ácido gálico) Aprendizaje: los animales se colocan dentro de la caja en el centro y se exponen durante 5 min a dos objetos idénticos que se encuentran colocados en una posición ya específica, para así permitir la exploración del animal durante el tiempo predeterminado. Se cuantifica el tiempo que el animal invierte para explorar cada uno de los objetos, al finalizar este tiempo la rata debe ser retirada de la caja y se debe limpiar.

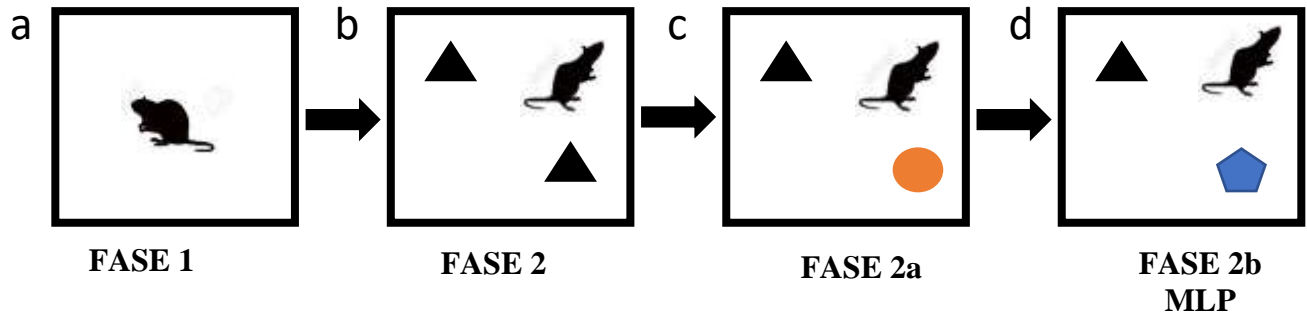
Fase 2a (Día 2 post-administración de ácido gálico) memoria corto plazo: la fase se realiza dos horas después de la prueba de aprendizaje, se sigue el mismo protocolo sólo que uno de los dos objetos utilizados anteriormente se cambia.

Fase 2b (Día 3 post-administración de ácido gálico) memoria largo plazo: la fase se realiza 24 horas después de la evaluación de la memoria a corto plazo. Se sigue el mismo protocolo de la etapa anterior y se sustituye el objeto que previamente fue sustituido en la fase 2a.

Durante cada etapa se mide el tiempo en el sujeto toca el objeto con la nariz y/o patas delanteras o lo olfatea y se calcula el índice de memoria de reconocimiento utilizando la siguiente formula:

Dónde:  $T_{\text{novedoso}}$  = tiempo total que pasó explorando el objeto novedoso

$T_{\text{familiar}}$  = tiempo total que pasó explorando el objeto familiar



**Figura 4.** Descripción gráfica de la prueba de NORt, se observa el proceso de habituación (a), familiarización (b), evaluación de memoria a corto plazo (c) y evaluación de memoria a largo plazo (d) (Antunes *et al.*, 2011).

## 5.2 Eutanasia y obtención de las muestras.

Al finalizar las pruebas conductuales, los grupos experimentales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo a la NOM062-ZOO-1999, cuyo objetivo es inducir al animal a un estado de inconsciencia rápido y muerte sin dolor. Los animales fueron sedados con pentobarbital sódico 40mg/kg administrado por vía intraperitoneal, se colocó en una charola para disección en posición decúbito dorsal, se le abrió la parte torácica para descubrir el corazón, posteriormente se recolectó una muestra de sangre total de aproximadamente 5ml mediante punción cardíaca y se colocó en un tubo seco previamente rotulado para después medir glucosa, triglicéridos, LDL, HDL, VLDL, colesterol total y ácidos grasos libres mediante técnicas colorimétricas.

Posteriormente se inició la perfusión intracardiaca con solución salina, al terminar de perfundir se extrajo el cerebro y se colocó en frascos con paraformaldehído al 4% como conservador durante 48 horas para ser conservados y fijados.

## 5.3 Inclusión en parafina

Los cerebros preservados en paraformaldehído fueron divididos en 2 partes para llevarlos por procesos de deshidratación, aclaramiento, infiltración e inclusión en parafina. Para el proceso de deshidratación los cerebros se colocaron en alcohol a concentraciones crecientes (70, 80, 96 y 100%). Al finalizar la deshidratación los cerebros fueron llevados al proceso de aclaramiento a través de soluciones de xilol-alcohol (1:1) y xilol (x2) durante una hora en cada solución. Para la infiltración se colocaron los cerebros en parafina líquida a una temperatura entre 48-52°C durante 2 horas, transcurrido este tiempo las secciones del cerebro fueron incluidas en parafina Paraplast nueva para la formación de los bloques. Estos bloques se cortaron en un micrótopo para la obtención de rebanadas de 5µm de grosor, las cuales se montaron en portaobjetos silanizados para su posterior uso en técnicas histológicas e histoquímicas.

#### **5.4 Técnicas histológicas e histoquímicas**

##### ***Tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E)***

Para observar la morfología celular, el fundamento de la técnica son las diferencias ácido-base de los colorantes, la hematoxilina es un colorante básico que diferencia el núcleo celular que coloreándolo de azul, y la eosina que es un colorante ácido que tiñe el citoplasma en un tono rosa, para determinar si había alteración en las neuronas hipocampales.

Para esto una vez desparafinados y rehidratados los tejidos se tiñeron con el colorante básico que es la Hematoxilina, se lavaron con agua y se colocó el colorante ácido Eosina, se volvieron a deshidratar y se eliminó el resto de colorantes con alcohol en concentraciones crecientes y xilol, una vez terminado se bloquearon con resina y se observó la morfología celular principalmente en el hipocampo en las regiones CA1, CA3 y GD y se tomaron fotografías a 40x.

##### **Inmunohistoquímica**

Los tejidos adheridos a los portaobjetos se sometieron al desparafinado con xilol y rehidratado con etanol en porcentajes decrecientes (100, 96 y 80 %) hasta llegar al agua destilada. Posteriormente, los tejidos se lavaron con PBS por cinco minutos y delimitados con plumón hidrofóbico. Posteriormente, los tejidos se bloquearon con albúmina sérica de bovino (ASB) libre de IgGs (Sigma) al 2% en PBS durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente y después fueron permeadas con Tritón X - 100 al 0.2% en PBS durante diez minutos. En la siguiente etapa, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Los anticuerpos que se utilizarán fueron: anti-sinaptofisina (Millipore) (1: 1000); anti-caspasa 3 (Santa Cruz biotechnology) (1: 100); anti-NOS-2 (Santa Cruz biotechnology) (1: 100); por separado. Para la inmunodetección indirecta se utilizaron anticuerpos secundarios bioespecíficos conjugado con fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) (1: 100), durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidos de la luz. Finalmente, las preparaciones se montaron con medio Vecta-Shield (VectorLabs) conjugado con DAPI (2,4-diamino-2-fenilindol), (un intercalador de ácidos nucleicos), en un cuarto oscuro. Las microfotografías se tomaron usando un microscopio de fluorescencia (marca Olympus) acoplado a una cámara digital, para observar las regiones CA1, CA3 y GD de hipocampo a 40X de aumento. Posteriormente se realizó el análisis cualitativo con el programa Image-J (NCBI).

## **6.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos se graficaron como la media  $\pm$  el error estándar (ESM). Posteriormente serán analizados estadísticamente por medio de una prueba de ANOVA de una vía considerando una significativa cuando  $p < 0.05$ .

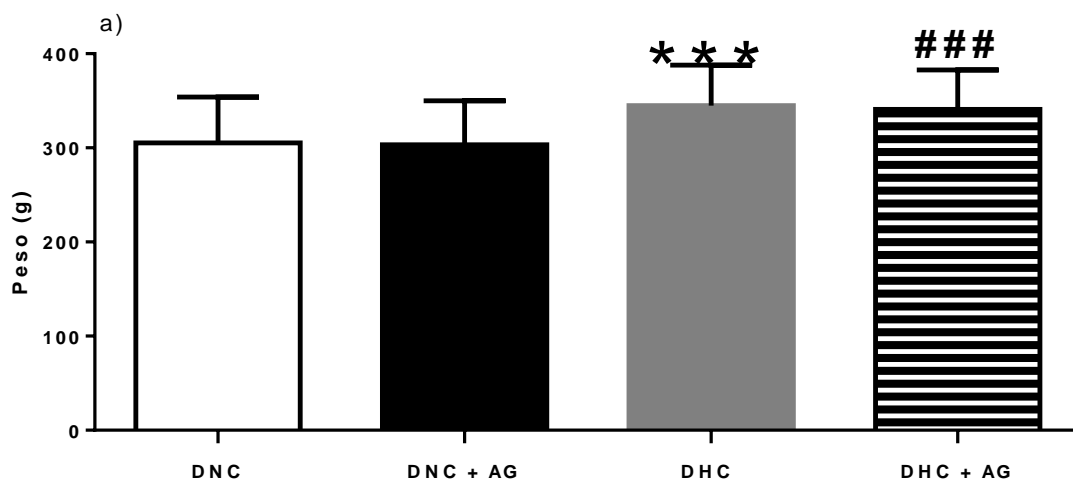
## 7.0 RESULTADOS.

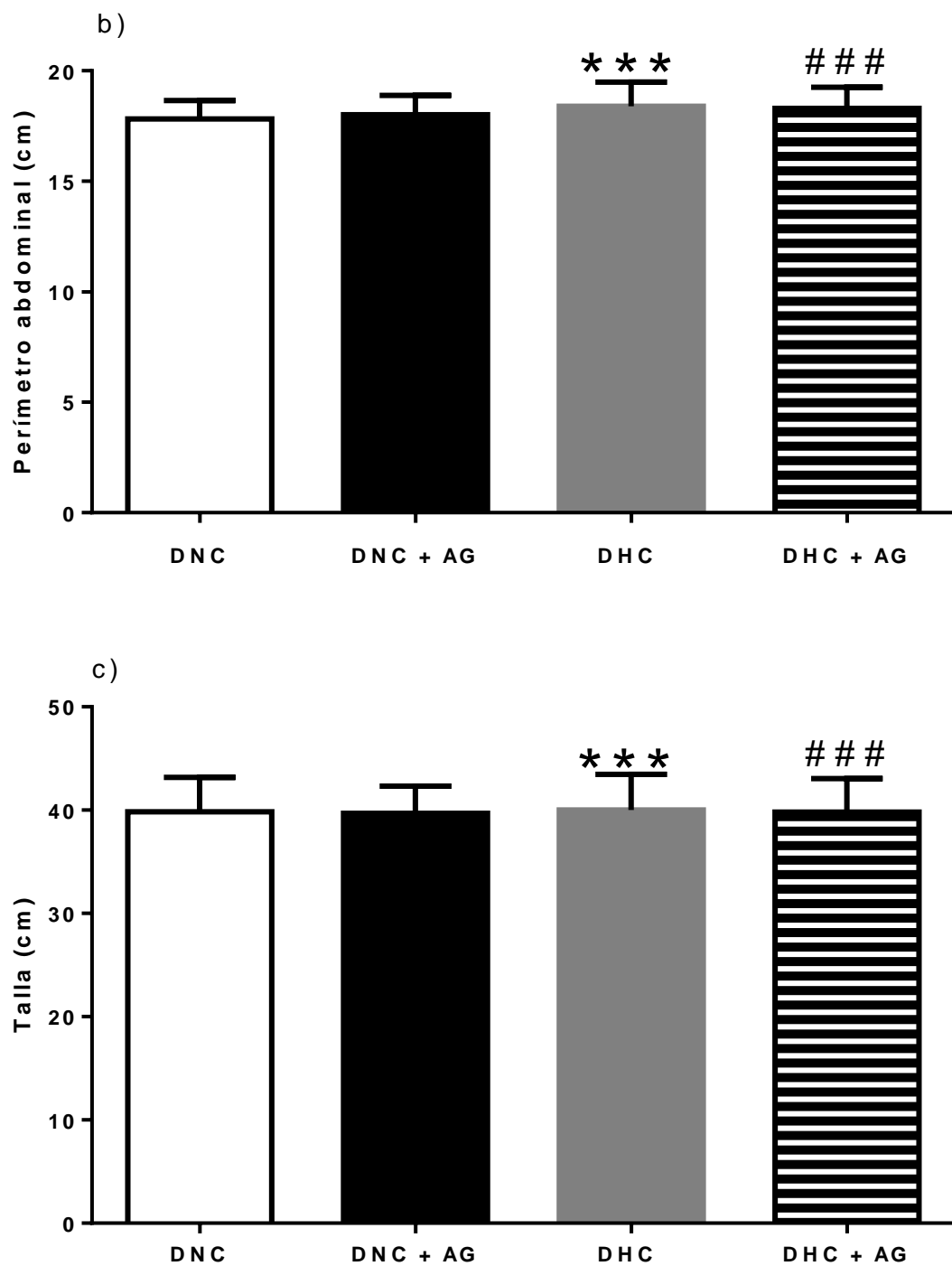
### 7.1 El AG disminuye las alteraciones zoométricas en ratas con SM.

Los parámetros que se analizaron fueron peso, talla, diámetro de cintura siguiendo lo que indica la bibliografía ya que se ha observado que estos en conjunto se relacionan con las alteraciones del metabolismo de lípidos y carbohidratos y sirven como pauta para el diagnóstico del SM.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que la dieta hipercalórica reproduce las características del SM y que, los grupos tratados con AG presentan menor afectación en los parámetros zoométricos aun cuando se alimentaron con DHC.

Se observa que tal y como se esperaba, los grupos que consumieron dietas hipercalóricas tuvieron un incremento de peso significativo respecto a los que solo consumieron dieta normocalórica y que el grupo tratado con AG redujo en cierta medida el incremento de peso con respecto al grupo que solo recibió dieta hipercalórica, la diferencia es menor en los parámetros de perímetro abdominal y talla pero los cambios siguieron el mismo patrón que el peso, tal y como se observa en las siguientes gráficas.



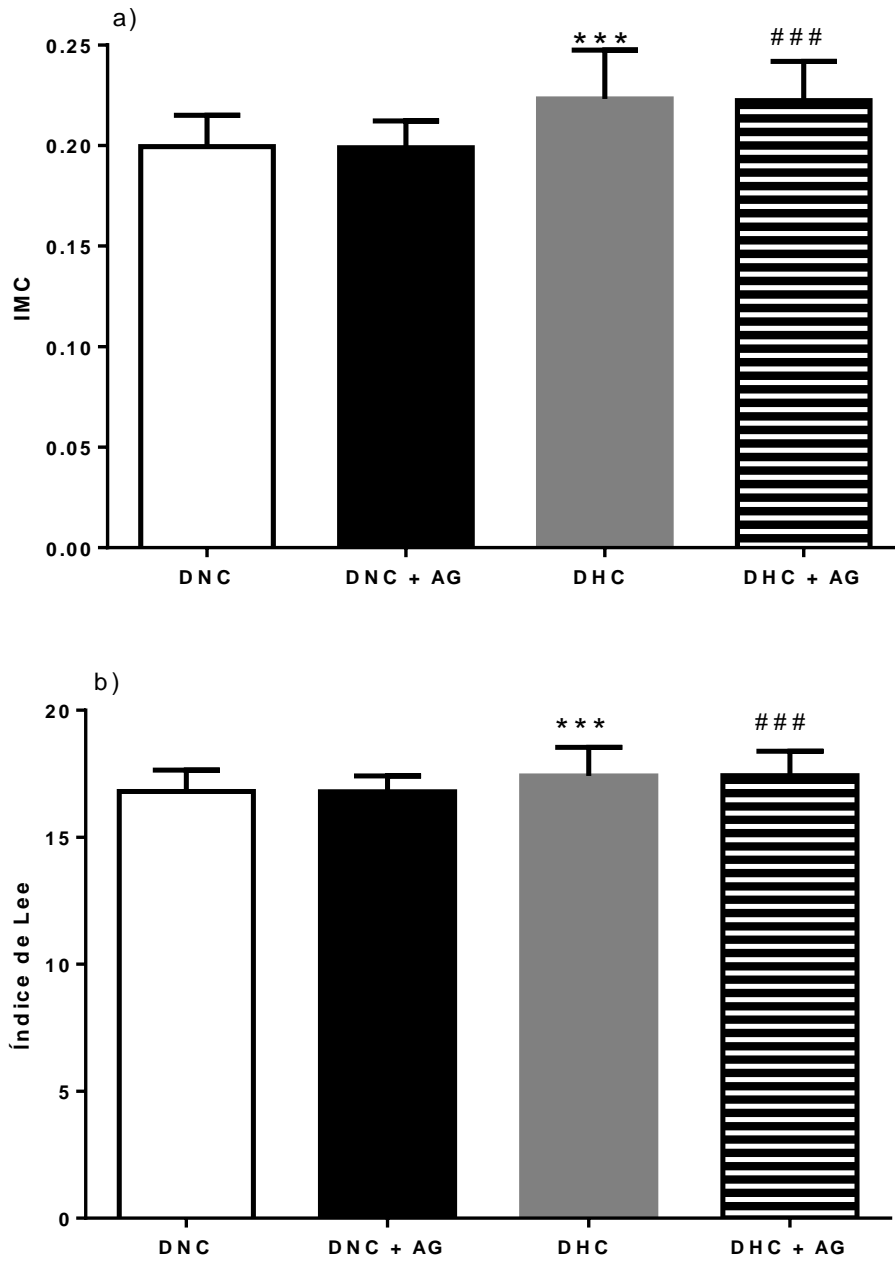


**Figura 5. Efecto del AG sobre los parámetros zoométricos inducidos por el SM.** Se muestran los resultados de peso (a), perímetro abdominal (b) y talla (c). ANOVA de una vía \*\*\* $p < 0.001$  (DNC vs DHC);  $p < 0.001$  (DHC vs DHC+AG).

Como se observa en la figura 5a, el grupo DNC+AG presentó un menor incremento de peso con respecto a los grupos que fueron alimentados con DHC, en estos grupos se observa como los animales que fueron alimentados con DHC y además tratados con AG tienen un menor incremento que los que no recibieron tratamiento. En la figura 5b, se observan las diferencias de los perímetros abdominales en cada uno de los grupos, donde se nota que el grupo DNC+AG tuvo una disminución en el incremento de volumen abdominal con respecto al grupo DHC y DHC+AG y que aun cuando la diferencia entre los dos últimos grupos es menor, se nota la mejoría en el grupo tratado con AG. En la figura 5c se muestra que el grupo con mayor incremento en talla fue el grupo con DHC y que el de menor crecimiento fue el grupo DNC+AG, sin embargo estas diferencias no son representativas.

La obtención de estos datos, permite obtener diversos índices que dan un indicio de forma indirecta del estado nutricional zoométrico de los animales en estudio, ya que aunque no miden directamente la grasa corporal tiene una correlación directa con ella y en el caso del índice de Lee es un buen indicador de riesgo cardíaco.

En los resultados de la figura 6 se observa como los animales alimentados con dieta hipercalórica tienen un mayor índice de masa corporal que las que solo recibieron dieta normocalórica y el IMC casi no es influido por la administración de AG, lo mismo se observa en la gráfica del índice de Lee donde el riesgo cardíaco se observa mayor en los grupos con dietas hipercalóricas y se observa la diferencia con el grupo control.



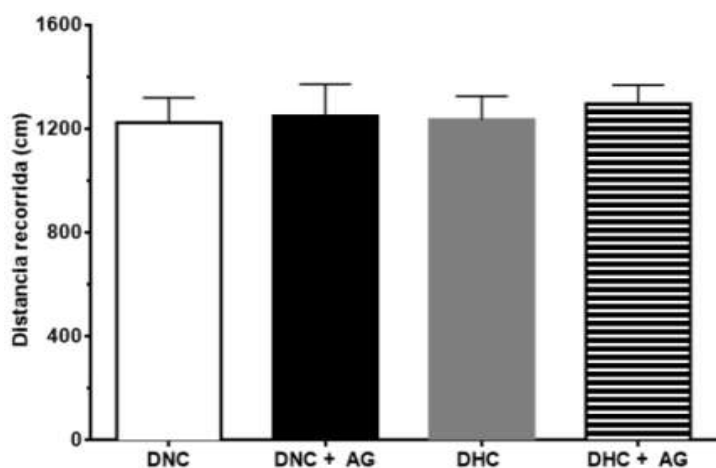
**Figura 6. Efecto del AG sobre el IMC y el índice de Lee en animales sanos y con SM.** Se muestran los resultados finales de IMC (a) e índice de Lee (b) en los cuatro grupos de análisis. ANOVA de una vía \*\*\* $p < 0.001$  (DNC vs DHC);  $p < 0.001$  (DHC vs DHC+AG).

## 7.2 El AG disminuye el daño que produce el SM en los procesos de aprendizaje y memoria a corto y a largo plazo.

También se realizaron pruebas conductuales y de aprendizaje y memoria para evaluar el daño que en SM causó y como el AG disminuye estas afectaciones.

Como resultado se obtuvo que tal y como se esperaba, la administración del ácido gálico provoca cambios en el comportamiento de los animales, en una evaluación de campo abierto realizada a los cuatro grupos se evaluó la movilidad y el nivel de estrés de los animales, como se observa en la figura 6, el grupo que más distancia recorrió fue el grupo con DHC+AG y el de menor distancia fue el grupo sin tratamiento, también se observa que el grupo con DHC+H<sub>2</sub>O presenta una disminución respecto al que si recibió AG.

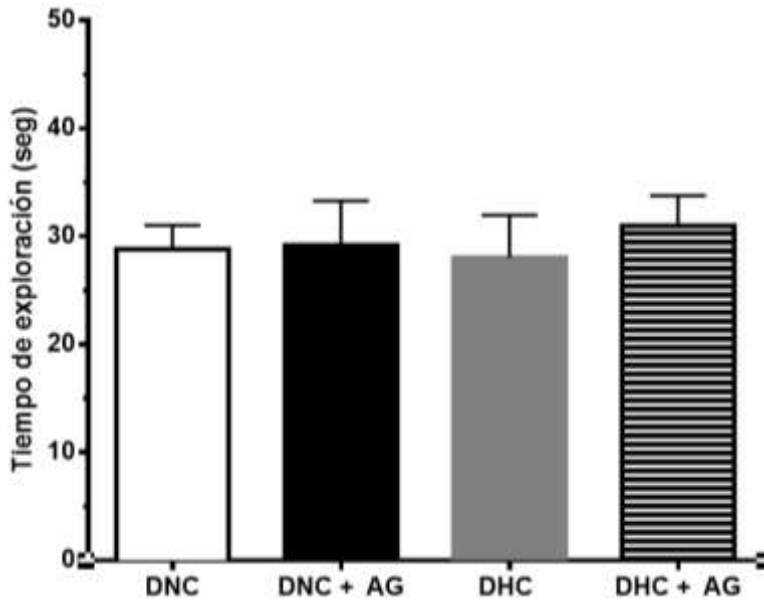
En la figura 7 se muestran los resultados del tiempo de exploración de los cuatro grupos de animales donde al igual que en la figura anterior, el grupo con mejor resultado fue el grupo con DHC+AG con una diferencia mayor con respecto a los demás grupos, se observa también que el grupo con menor tiempo de exploración es el grupo DHC+H<sub>2</sub>O que permaneció mayor tiempo estático, los grupos con DNC presentan una diferencia mínima entre los que recibieron AG y los que no.



**Figura 7. Evaluación de la distancia recorrida por animales con SM tratados con AG.** Se muestra la comparación entre los 4 grupos donde se observa un aumento entre los grupos que se les administró AG vs los grupos control. ANOVA de una vía; \*\* $p < 0.01$  (DNC VS DHC); # $p < 0.05$  (DHC vs DHC+AG)

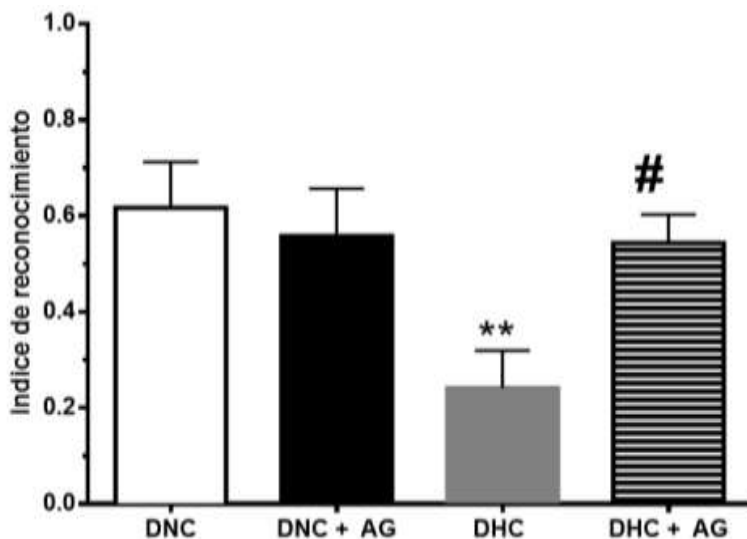
Una vez terminadas estas pruebas, se evaluó la memoria a corto plazo en todos los grupos donde aprecia que el AG mejora la memoria a corto plazo mientras que el síndrome metabólico (grupo DHC) presenta una disminución significativa, los

grupos con DNC muestran como el SM afecta directamente los procesos de memoria a corto plazo.

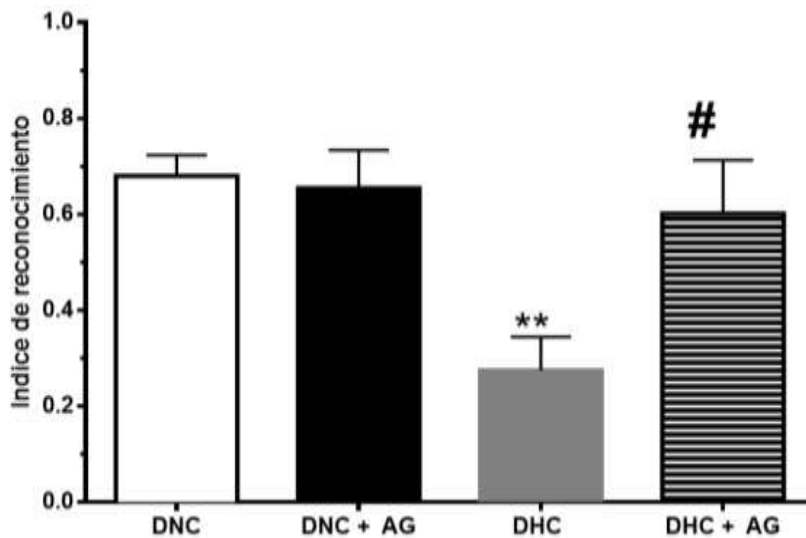


**Figura 8. Evaluación del tiempo de exploración de animales con SM tratados con AG.** Se muestra la comparación entre los 4 grupos donde se observa un aumento entre los grupos que se les administró AG vs los grupos control. ANOVA de una vía; \*\* $p < 0.01$  (DNC VS DHC); # $p < 0.05$  (DHC vs DHC+AG)

Al analizar la memoria a largo plazo se obtuvo que, el índice de reconocimiento del grupo DNC es mayor que el del resto de los grupos siendo el grupo DHC el del índice menor seguido por el grupo DHC+AG lo que demuestra que el AG disminuye el daño que causa el SM en la memoria.



**Figura 9. Evaluación del índice de reconocimiento a corto plazo en grupos de animales con SM tratados con AG.** Se muestra la comparación entre los 4 grupos donde se observa un aumento entre los grupos que se les administró AG vs los grupos control. ANOVA de una vía; \*\* $p < 0.01$  (DNC VS DHC); # $p < 0.05$  (DHC vs DHC+AG)



**Figura 10. Evaluación del índice de reconocimiento a largo plazo en grupos de animales con SM tratados con AG.** Se muestra la comparación entre los 4 grupos donde se observa un aumento entre los grupos que se les administró AG vs los grupos control. ANOVA de una vía; \*\* $p < 0.01$  (DNC VS DHC); # $p < 0.05$  (DHC vs DHC+AG)

### 7.3 El AG disminuye los niveles séricos de insulina, glucosa y las fracciones lipídicas incrementados por el SM.

Para complementar el análisis zoométrico y conductual y así poder dar un resultado según los requerimientos mínimos establecidos, se evaluaron parámetros séricos prioritarios, que contribuyen a identificar alteraciones metabólicas características del SM (dislipidemias y disglucemias) que además se relacionan con la arterosclerosis, diabetes y enfermedades cardíacas. Se decidió analizar a los triglicéridos debido a que estos son un marcador importante de desorden metabólico endógeno y se les asocia con el incremento de colesterol total. Los resultados que se muestran en la tabla, sugieren estados de desregulación metabólica y resistencia a insulina a los grupos que no recibieron tratamiento, en cambio, los que tuvieron dieta normocalórica o bien, recibieron tratamiento, no tienen cifras tan elevadas en sus resultados.

En la tabla 4 se muestran estos resultados evidenciando el incremento de insulina circulante lo que sugiere resistencia a la insulina principalmente en el grupo no

tratado (DHC+H<sub>2</sub>O) mientras que el grupo DCH+AG presenta una ligera disminución pero la diferencia es mayor con respecto a los grupos que no fueron alimentados con DHC.

En la tabla se observa como tanto los triglicéridos como la glucosa se elevan de manera considerable en los grupos con DHC y que el grupo control (DNH+H<sub>2</sub>O) presenta valores normales, también se observa que el ácido gálico disminuye las alteraciones glúcidas en un alto porcentaje aun cuando el grupo recibió DHC.

| GRUPO  | INSULINA*     | Tg (mg/dL)*    | Glucosa*        |
|--------|---------------|----------------|-----------------|
| DNC    | 10.02 +/-1.31 | 72.46 +/-4.82  | 102.0 +/-2.70   |
| DNC+AG | 15.44 +/-0.59 | 84.38 +/-4.34  | 118.20 +/-2.44  |
| DHC    | 63.14 +/-4.56 | 124.56 +/-4.72 | 209.80 +/-12.63 |
| DHC+AG | 42.56 +/-3.10 | 136.40 +/-6.48 | 99.24 +/-4.43   |

**Tabla 4. Evaluación de los valores séricos de animales con SM tratados con AG.** Se muestra la comparación entre los 4 grupos donde se observa una diferencia notable entre los grupos que se les administró AG vs los grupos control. Resultados de los cuatro grupos con los valores de insulina, triglicéridos (Tg) y glucosa. \*Técnica colorimétrica.

También se realizó el desglose de las fracciones lipídicas, otros parámetros importantes en el aspecto bioquímico del SM y las enfermedades que implica como la DM2. Las fracciones valoradas fueron HDL (colesterol de alta densidad) LDL (colesterol de baja densidad) y VLDL (colesterol de muy baja densidad). La alta ingesta calórica incrementa la concentración de FFA plasmáticos y disminuye la concentración de HDL incrementando las otras fracciones tal y como se observa en la tabla en el grupo que únicamente recibió dieta hipercalórica, mientras que todas las demás fracciones tienden a aumentar, esto sigue el mismo patrón para los grupos que en algún momento del estudio recibieron dieta hipercalórica y es inversamente proporcional para el grupo que recibió tratamiento con el AG.

#### 7.4 El AG disminuye el daño a células beta-pancreáticas, el riesgo a RI y el

| GRUPO  | LDL (mg/dL)*  | HDL (mg/dL)*  | VLDL (mg/dL)* | Col T (mg/dL)* | FFA (mg/dL)* |
|--------|---------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| DNC    | 25.82 +/-2.08 | 48.56 +/-2.60 | 14.49 +/-0.96 | 88.87 +/-3.74  | 1.98 +/-0.20 |
| DNC+AG | 16.00 +/-1.31 | 62.00 +/-2.69 | 16.88 +/-0.87 | 94.88 +/-3.94  | 3.92 +/-0.56 |
| DHC    | 58.72 +/-4.25 | 13.60 +/-1.55 | 24.91 +/-0.94 | 97.23 +/-4.53  | 11.38 0.61   |
| DHC+AG | 30.28 +/-1.87 | 33.30 +/-2.74 | 27.28 +/-1.30 | 90.86 +/-2.46  | 4.90 +/-0.52 |

**Tabla 5. Resultados de las pruebas séricas de las fracciones lipídicas.** Se muestra la comparación entre los 4 grupos donde se observa un aumento entre los grupos que se les administró AG vs los grupos control. Resultados de los cuatro grupos con los valores séricos de las fracciones lipídicas (LDL, HDL, VLDL, ColT y FFA). \*Técnica colorimétrica.

#### índice de riesgo cardíaco.

Al obtener los niveles séricos de glucosa e insulina, fue posible obtener el índice del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina que permite evaluar de manera indirecta el funcionamiento de las células beta del páncreas y ayuda a determinar el riesgo en el que se encuentra una persona con SM, como se observa en la tabla 6, el grupo con dieta hipercalórica sin tratamiento con AG presento un alto índice HOMA-IR dando por hecho que su resistencia a la insulina es elevada, mientras que en el grupo con DHC tratada con AG disminuye notablemente, se observa el mismo patrón para el índice HOMA-Beta el cual indica el daño que padecen las células beta del páncreas. Mientras que los grupos que fueron alimentados con DNC más ácido gálico merman de manera significativa la elevación de ambos índices.

| GRUPO  | HOMA-IR      | HOMA-S%        | HOMA-Beta%      |
|--------|--------------|----------------|-----------------|
| DNC    | 0.42 +/-0.05 | 257.04+/-37.18 | 32.03 +/-4.93   |
| DNC+AG | 0.75 +/-0.04 | 134.42 +/-7.03 | 43.52 +/-1.46   |
| DHC    | 5.43 +/-0.45 | 18.97 +/-1.67  | 106.89 +/-11.30 |
| DHC+AG | 1.74 +/-0.16 | 59.41 +/-5.64  | 101.50 +/-11.34 |

**Tabla 6. Obtención de los índices HOMA de todos los grupos de estudio.** Se observa un incremento en los grupos con SM al compararlo al grupo al que se le administró AG.

Conocer el estado de las células pancreáticas permite saber la generación y la disponibilidad de insulina que un organismo tiene presente y todos los datos anteriores brindan información respecto a la disfunción adipocitaria por resistencia a la insulina y el índice de resistencia a la insulina a nivel cardiovascular tal y como se observa en la tabla 7, la disposición de insulina merma a medida que el daño se produce por la dieta hipercalórica sin tratamiento y el porcentaje es mayor cuando se administra ácido gálico y la disfunción adipocitaria que este desorden produce incrementa al administrar DHC sin tratamiento y disminuye cuando se lleva una dieta normal y se recibe AG.

| GRUPO  | Índice de generación de insulina | Índice de disposición de Insulina | Índice de disfunción adipocitaria por Res a Ins | Índice de Resistencia a Insulina cardiovascular |
|--------|----------------------------------|-----------------------------------|---|---|
| DNC    | 0.10 +/-0.01                     | 0.24 +/-0.01                      | 0.17 +/-0.03                                    | 0.63 +/-0.09                                    |
| DNC+AG | 0.13 +/-0.00                     | 0.17 +/-0.01                      | 0.13 +/-0.02                                    | 1.04 +/-0.10                                    |
| DHC    | 0.31 +/-0.03                     | 0.06 +/-0.01                      | 0.97 +/-0.03                                    | 51.90 +/-6.33                                   |
| DHC+AG | 0.43 +/-0.03                     | 0.25 +/-0.02                      | 0.62 +/-0.05                                    | 7.60 +/-1.51                                    |

**Tabla 7. Índices generados a través de los resultados séricos de los grupos de análisis.** Representa a los cuatro grupos con los parámetros de índice de generación de insulina, índice de disposición de insulina, índice de disfunción adipocitaria por resistencia a la insulina e índice de resistencia a la insulina cardiovascular.

Al reunir los datos anteriores se evaluó el índice aterogénico el cual demostró ser más elevado en los grupos que recibieron dieta hipercalórica ya que al ser comparado con el grupo control se observa un incremento de casi seis veces más, cabe resaltar que el grupo que recibió tratamiento con AG y una dieta normocalórica tiene un índice menor que incluso el control.

Respecto al riesgo cardiovascular se observa el mismo comportamiento donde se denota que al administrar el AG disminuye significativamente el índice de riesgo cardiovascular y la mejoría es notable en los sujetos con dieta normocalórica y se trató con el antioxidante, el patrón se repite con el riesgo coronario, lo que confirma que los sujetos con dieta hipercalórica tienen un mayor riesgo a presentar complicaciones relacionadas al descontrol lipídico tal y como lo muestra la tabla 8.

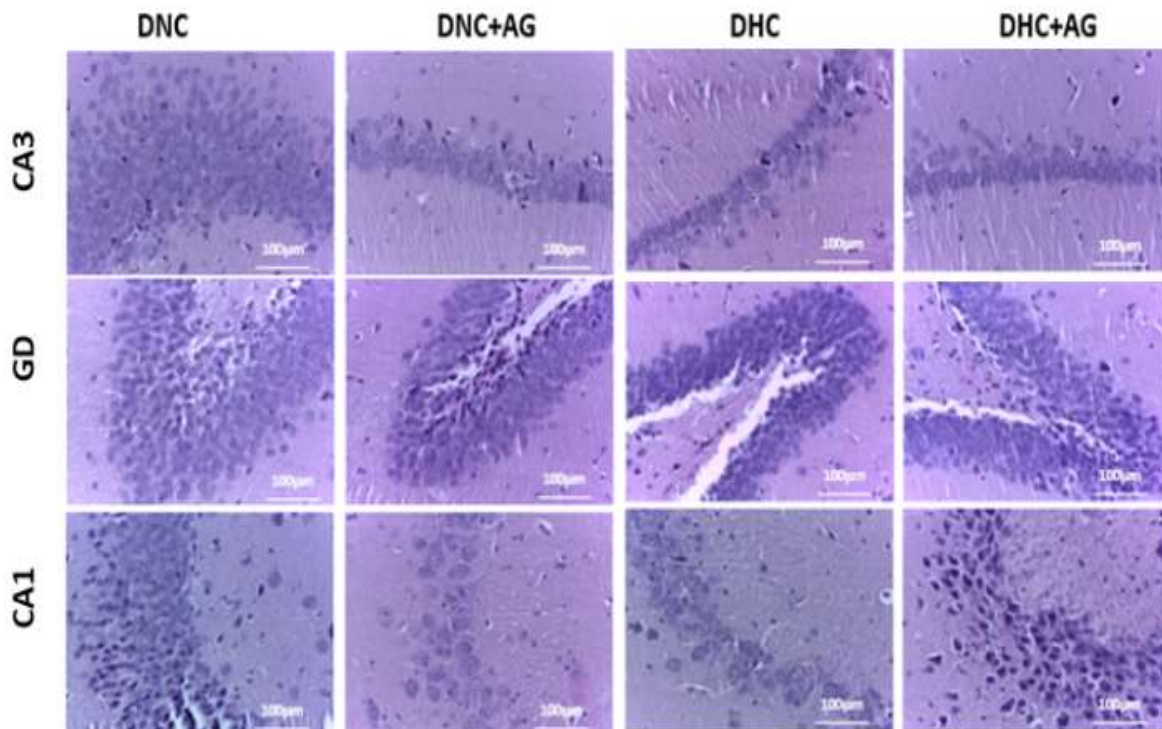
| GRUPO   | Índice Aterogénico | Índice riesgo cardiovascular | Índice riesgo coronario |
|---------|--------------------|------------------------------|-------------------------|
| DNC+H2O | 1.84 +/-0.05       | 0.54 +/-0.05                 | 0.84 +/-0.05            |
| DNC+AG  | 1.53 +/-0.02       | 0.26 +/-0.02                 | 0.53 +/-0.02            |
| DHC+H2O | 7.42 +/-0.72       | 4.53 +/-0.63                 | 6.42 +/-0.72            |
| DHC+AG  | 2.78 +/-0.18       | 0.93 +/-0.10                 | 1.78 +/-0.18            |

**Tabla 8.** Resultados del índice aterogénico, riesgo cardiovascular e índice de riesgo coronario de los cuatro grupos.

Obtenidos estos resultados, se realizó el análisis histológico de la región hipocampal del cerebro de las ratas, lo que evidenció que el SM provoca degeneración en la morfología celular e induce daño en las funciones de aprendizaje y memoria.

### **7.5 Efecto del AG sobre la morfología celular de las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratas con SM.**

Para analizar la morfología y estructura celular del hipocampo, los tejidos se tiñeron con el método de H&E. El análisis se realizó en la zona de giro dentado, CA1 y CA3 del hipocampo, al comparar las muestras tratadas con dieta hipercalórica contra las muestras control, al compararlas se observó notablemente la atrofia y el daño celular al que induce el SM. También se evidenció la disminución celular que fue mayor en el grupo que no recibió tratamiento con antioxidante, mientras que en el grupo que únicamente se trató con antioxidante la morfología celular está casi intacta con núcleos bien denotados.



**Figura 10.** Se muestran las fotomicrografías correspondientes a la tinción Hematoxilina-Eosina en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo, donde se puede observar la morfología celular, en los grupos con DNC y DHC, con y sin tratamiento, se observa como la alteración es mayor en las células con SM sin tratamiento. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.

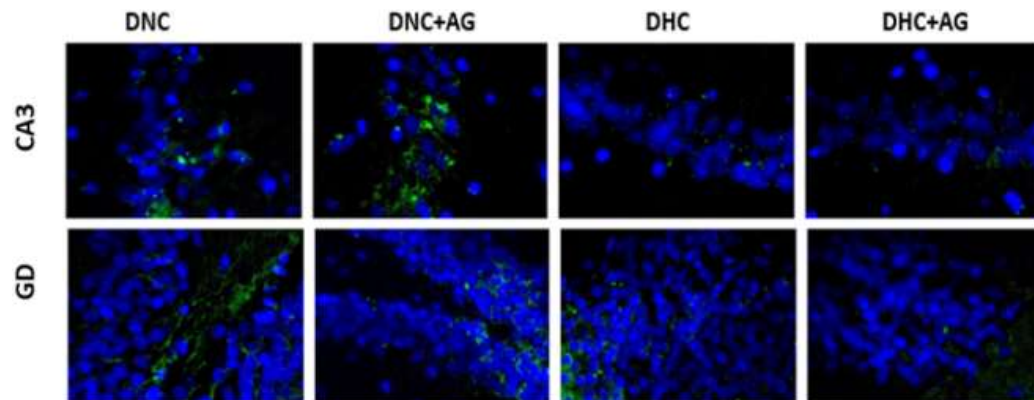
## 7.6 El AG disminuye el daño que produce el SM sobre la inmunorreactividad de las células del hipocampo a Sinaptofisina (Syn).

Se realizó además un grupo de inmunohistoquímicas para analizar el efecto del síndrome metabólico sobre la inmunorreactividad de la sinaptofisina (Syn) y la manera en que el AG influye como tratamiento.

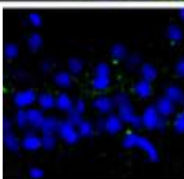
Como se sabe, la sinaptofisina es una glicoproteína de las vesículas sinápticas que interviene en el proceso de expulsión de neurotransmisores, eventos como el estrés oxidativo que causa el síndrome metabólico tienden a variar su presencia alterando la liberación de neurotransmisores de las vesículas sinápticas afectando la comunicación neuronal.

La inmunorreactividad de la Syp fue evaluada en los mismos campos de interés (CA1, CA3 y GD) observando mayor coloración verde donde hay mayor presencia de Syn y mayor coloración azul donde disminuye.

En el figura 6 en el grupo control se observa la presencia de la glicoproteína de forma normal en los tres sitios, en el grupo tratado con AG y dieta normocalórica se observa un ligero incremento de inmunorreactividad mientras que en el grupo alimentado con dieta hipercalórica y administrado con agua se observa una notable ausencia de fluorescencia, en el grupo alimentado con dieta hipercalórica y tratado con AG se observa un ligero incremento de coloración.



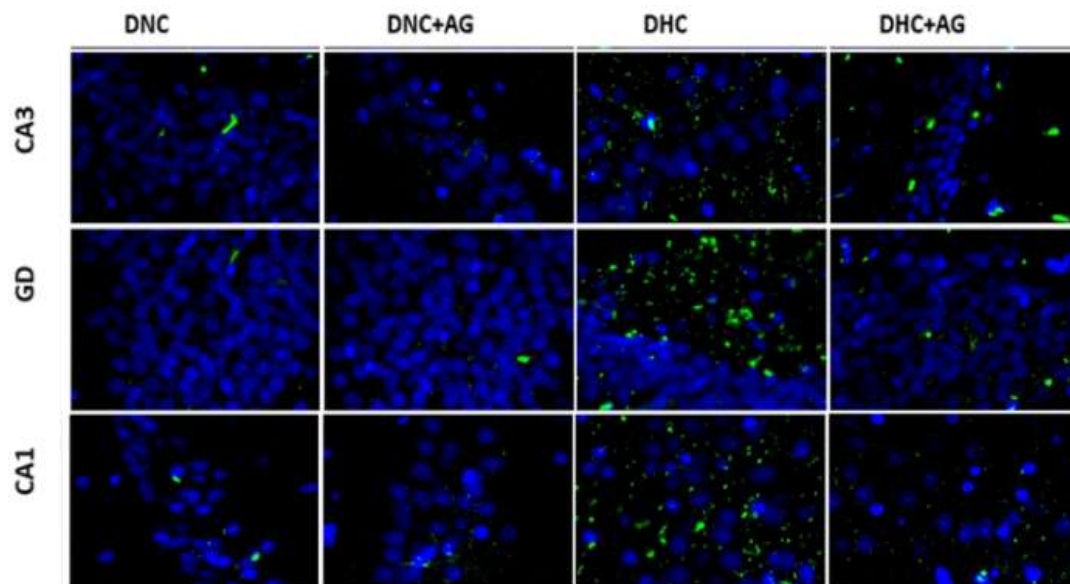
**Figura 11. Microfotografías de áreas CA1, CA3 y GD del hipocampo tratadas en anticuerpos específicos para Syn.** Se observan las variaciones de inmunorreactividad en las diferentes áreas con los diferentes tratamientos en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo de los grupos con DNC y DHC, con y sin tratamiento. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.



### 7.7 El AG disminuye la inmunorreactividad de Caspasa-3 (Casp-3) ocasionada por el SM.

La segunda inmunohistoquímica realizada fue para analizar como el SM incrementa la inmunorreactividad de Caspasa-3 (Casp-3), mientras que el AG disminuye de manera significativa su aparición.

La caspasa-3 es un indicador significativo de muerte celular mediante apoptosis. En los tejidos se observó su inmunorreactividad en las áreas de interés en tono verde y las células sanas se observaron en tono azul. En la figura se observa que el grupo control y el grupo con dieta normocalórica más tratamiento con ácido gálico presentan una mínima muerte celular lo que podría traducirse como normal. En el grupo alimentado con dieta hipercalórica sin tratamiento se observa un marcado incremento de muerte celular en las tres áreas estudiadas, en el último grupo se observa como el ácido gálico disminuye en cierta medida la apoptosis (Figura 12).

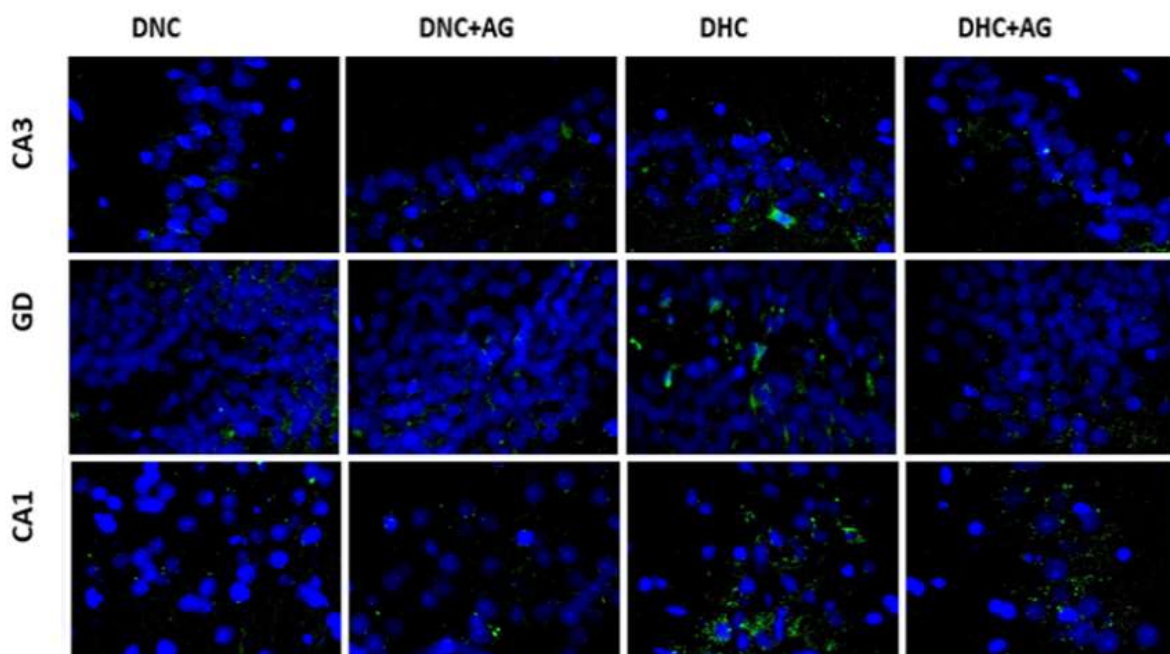


**Figura 12. Microfotografías de áreas CA1, CA3 y GD del hipocampo tratadas anticuerpos específicos para Casp-3.** Se observan las variaciones de inmunorreactividad en las diferentes áreas con los diferentes tratamientos. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.

### 7.8 El AG disminuye la inmunorreactividad de NOS2 en condiciones de SM.

La tercera inmunohistoquímica realizada fue la de NOS2 para demostrar como el SM incrementa su inmunorreactividad y que, al igual que los casos previos, el AG disminuye de manera significativa su aparición.

El NOS2 es un indicador relevante del estrés oxidativo. En los tejidos se observó su inmunorreactividad en las áreas de interés en tono verde y las células sanas se observaron en tono azul. En la figura se observa que el grupo control y el grupo con dieta normocalórica más tratamiento con ácido gálico presentan una mínima reactividad. En el grupo alimentado con dieta hipercalórica sin tratamiento se observa un marcado incremento en la presencia de NOS2 en las tres áreas estudiadas, en el último grupo se observa como el ácido gálico disminuye en cierta medida su aparición tal y como se observa en la figura 13.



**Figura 13. Microfotografías de áreas CA1, CA3 y GD del hipocampo tratadas anticuerpos específicos para NOS2.** Se observan las variaciones de inmunorreactividad en las diferentes áreas con los diferentes tratamientos. Aumento 40X. Fotografías tomadas mediante un microscopio acoplado a una cámara fotográfica Leica.

## 8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El SM es un trastorno multifactorial que afecta a un gran número de personas a nivel mundial y sus implicaciones han sido asociadas con demencia y deterioro cognitivo. Se caracteriza por presión arterial elevada, colesterol y otros parámetros lipídicos anormales, diabetes, resistencia a la insulina, IMC elevado y obesidad central (Panzaa *et al.*, 2010).

Anteriormente se habló de como el SM afecta los valores zoométricos en el modelo animal, los resultados muestran una alteración en la estructura y función neuronal a nivel del hipocampo, lo que se traduce en trastornos de aprendizaje y memoria debido a la atrofia neuronal del sistema límbico. (Panzaa *et al.*, 2010).

Desde que se describió el SM se han buscado alternativas terapéuticas a nivel mundial. En 2015 Treviño y colaboradores desarrollaron un modelo experimental para reproducir el SM que además permite mostrar la neurodegeneración en el hipocampo y corteza temporal como una consecuencia del estrés oxidativo y la inflamación en estas neuronas.

Se ha propuesto el uso de antioxidantes como principal alternativa terapéutica con el menor número de efectos secundarios, entre los que destaca el ácido gálico, el cual al ser una propuesta terapéutica natural, brinda efectos neuroprotectores al daño celular inducido principalmente por estrés oxidativo disminuyendo el deterioro cognitivo.

El propósito de este trabajo fue valorar en un modelo animal con SM el daño que se produce a nivel del hipocampo. Para esto, se realizó un análisis conductual, histológico-inmunohistoquímico para demostrar el efecto que el AG tiene como neuroprotector en un modelo murino con SM.

El primer objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del AG sobre los valores zoométricos y bioquímicos del SM. Los parámetros zoométricos evaluados fueron peso, perímetro abdominal y talla, los bioquímicos fueron triglicéridos, colesterol total, LDL, HDL y en base a esos resultados se evaluaron los índices HOMA. En el grupo DHC+AG (grupo con SM) estos resultados tienen diferencias significativas al ser comparados con el grupo DHC, haciendo que se vuelvan similares a los del

grupo con DNC (grupo sin SM). Estos resultados coinciden con otros estudios donde se afirma que el AG disminuye significativamente los niveles de lípidos, índices cardiovasculares y aterogénicos, incrementando los niveles de insulina, disminuyendo así el riesgo de padecer DM (Moneim *et al.*, 2018).

Se evaluó también el efecto del AG en los procesos de aprendizaje y memoria donde se muestra una tendencia de mejoría en los grupos con AG tanto a corto como a largo plazo, se observa que el grupo DNC+AG presenta una notable mejoría en ambos procesos, el grupo DHC+AG disminuye en el índice de reconocimiento con respecto al primero pero sin presentar una afectación mayor, cambio en el grupo con DHC sin tratamiento se aprecia una disminución en ambos procesos. Esto indica que el AG permite un mejor desempeño en la actividad hipocampal (Sarkaki *et al.*, 2014), estudios indican que los sujetos obesos tienen afecciones en la memoria tanto dependiente como independiente del hipocampo, relacionado a obesidad visceral, DM, hiperinsulinemia y otros factores del SM (Farr *et al.*, 2008) (Luchsinger *et al.*, 2012). Estos resultados comprueban que el AG beneficia la memoria a corto y largo plazo aun en sujetos con SM.

En los resultados séricos se observa un incremento de las fracciones de VLDL y LDL relacionado a una disminución de la concentración de HDL en los grupos con dieta hipercalórica, así mismo se observa que el consumo de carbohidratos incrementa al nivel de colesterol total en circulación. Al inducir a los animales SM y a su vez a resistencia a la insulina. Las VLDL comienzan a transportar el exceso de triglicéridos fuera del hígado. Así mismo, los FFA también intervienen en el proceso de RI a nivel periférico y a nivel hepático, relacionándolos con otros factores de riesgo cardiovascular incluidas las dislipidemias y la hipertensión arterial (Randle *et al.*, 1963).

En el análisis presentado fue posible observar que de acuerdo a lo esperado los animales presentaron un incremento en las VLDL, LDL, sugiriendo un estado de SM en consecuencia a la dieta hipercalórica, también se observó el incremento en la grasa visceral en relación a la grasa corporal lo que según lo describe Arriola en su

investigación de 2017, aumenta la posibilidad de desarrollar diabetes, hipertensión, hiperlipemia y arterosclerosis.

Con los resultados obtenidos se observa que el SM no solo incrementa la absorción y metabolismo de FFA en músculo, sino que disminuye la captación de glucosa a nivel muscular, lo cual aumenta con respecto al tiempo de administración de dieta hipercalórica, para generar un fenotipo bioquímico característico del síndrome que Reaven describió como SM. Se ha relacionado a estos desordenes sistémicos (DMT2, obesidad y SM) como factores de riesgo para enfermedades neurodegenerativas ya que una dieta hipercalórica-hiperglúcida influye de manera directa en procesos de aprendizaje y memoria provocando neurodegeneración en el hipocampo y la corteza temporal, así como el aumento de estrés oxidativo (Freeman *et al.*, 2011; Treviño *et al.*, 2015).

Está comprobado que en condiciones de estrés oxidativo, existe una disminución de antioxidantes y un incremento de radicales libres así como de ácidos grasos libres, lo que induce una alteración en la morfología celular que de forma gradual induce a la muerte celular (García, 2015) tal y como se observa en las microfotografías de los resultados obtenidos con la tinción de H&E de los grupos que fueron alimentados con dieta hipercalórica donde el daño y la muerte celular se evidencia por los núcleos picnóticos, cariólisis y basofilia en las áreas de CA-1 CA-3 y GD del hipocampo.

Se sospecha que uno de los factores que influye en el daño neuronal es el daño que se produce a nivel sináptico debido a la alteración de la liberación de neurotransmisores en vesículas secretoras de la neurona pre-sináptica.

Se realizó el análisis inmunohistoquímico de Sinaptofisina (Syp) para determinar el estado de la comunicación neuronal. En las microfotografías de la figura 6 se observa una disminución notoria en su inmunorreactividad en los grupos con DHC confirmando que se altera la funcionalidad de las vesículas secretoras y a su vez la neurotransmisión implicada en procesos de memoria y aprendizaje. Se observa como los grupos con SM tienen menor tendencia a presentar inmunorreactividad debido al daño que provoca en el proceso de neurotransmisión debido al nivel tan

elevado de estrés oxidativo al que induce bloqueando de cierta forma la comunicación neuronal, caso contrario en los grupos tratados con AG lo que indica que el AG atenúa los efectos del SM sobre esta glicoproteína.

En los resultados de Casp-3 se observa como el proceso de muerte celular por apoptosis incrementa en los grupos con SM, esto debido a que se sabe que esta y otras caspasas son las principales mediadoras en este proceso, mientras que los grupos que fueron tratados con AG disminuyen su aparición con o sin DHC.

El SM incrementa la cantidad de oxidantes y mediadores inflamatorios, los cuales cuando hay un daño celular se promueve la liberación del NO desencadenando un daño neuronal alterando las funciones cognitivas, los grupos con AG presentaron una disminución en la inmunoreactividad de NOs2, mientras que los grupos con DHC incrementaron en ambas dietas tal y cómo se observa en las microfotografías de la figura 8.

Los resultados del análisis realizado brindan pruebas del impacto que tiene el SM a nivel cognitivo y de cómo el AG revierte el daño provocado y brinda un efecto neuroprotector a las células neuronales, reduciendo el estrés oxidativo y mejorando los marcadores de plasticidad neuronal.

## **9.0 Conclusiones.**

Administrar una DHC reproduce el SM en ratas.

El SM provoca deterioro en la morfología celular de las neuronas a nivel de hipocampo en las regiones de CA-1, CA-3 y GD, lo que provoca una disminución significativa en los procesos de aprendizaje y memoria a corto y largo plazo, relacionado al incremento de estrés oxidativo provocado por el SM.

El SM reduce los procesos de neurotransmisión mediados por glicoproteínas como la sinaptofisina.

El estrés oxidativo que induce el síndrome metabólico provoca deterioro en la estructura y función celular del cerebro generando apoptosis y disfunción en los procesos de aprendizaje y memoria a corto y largo plazo.

El AG como alternativa terapéutica para sujetos con SM reduce el desbalance bioquímico en sujetos que lo padecen y en sujetos sanos mantiene el equilibrio, además de que favorece la comunicación neuronal incrementando la inmunorreactividad de sinaptofisina, favorece la plasticidad neuronal beneficiando los procesos cognitivos tanto a corto como a largo plazo y disminuye el daño que provoca el estrés oxidativo.

## **10.0 Perspectivas.**

- Extender el número de sujetos de estudio.
- Realizar la técnica de Golgi-Cox para evaluar la morfología neuronal del hipocampo.
- Efectuar otras técnicas inmunohistoquímicas para la detección de muerte neuronal.
- Evaluar el efecto del AG en los procesos de reversión de daño causado por DHC.

## 11.0 Bibliografía.

- A. Sarkaki, H. F. (2014). Gallic acid improves cognitive, hippocampal long-term potentiation deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.
- A. Sarkaki, H. F. (2014). Gallic acid improves cognitive, hippocampal long-term potentiation deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pakistan Journal of Biological*.
- Adel Abdel-Moneim, S. M.-T. (2018). Modulation of hyperglycemia and dyslipidemia in experimental type 2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.
- Adilson Guilherme, J. V. (2008). Adipocyte dysfunctions linking. *nature reviews molecular cell biology*, 367-377.
- Akhlaq A., F. T. (2012). Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Cellular and molecular Life Sciences*.
- Akira Kohsaka, J. B. (2006). A sense of time: how molecular clocks. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*.
- Andrea Valenzuela B., A. A. (2007). MEDITERRANEAN DIET AND ITS ROLE IN THE PREVALENCE OF METABOLIC SYNDROME. *SciELO*.
- Arriola, M. E. (2017). Efecto el síndrome metabólico provocado por una dieta rica en grasa en ratones APPswe/PS1de9, modelo experimental de la enfermedad de Alzheimer y posibles terapias farmacológicas. *UNIVERSITAT DE BARCELONA*.
- Bernardo Hernández Prado, R. U. (2009). Salud pública de México, 50 aniversario, 1959, 2009. vol. 51-2009.
- Berta Bello Rodríguez, G. S. (2012). Síndrome Metabólico: un problema de salud con múltiples definiciones. *SciELO*.
- Carmen Martha Elinos-Báez, V. M.-Z. (2001). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*.
- Christian Ortega Loubon, J. C. (2010). Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. Plasticidad Neuronal. *iMedPub*.
- Elena Daskalova, S. D.-K. (2015). Antiatherogenic and Cardioprotective Effects of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Juice in Aging Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Emanuelle Kerber Vieira, S. B. (2011). Quercetin Treatment Ameliorates Systemic Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. *International Scholarly Research Notices*.

- Francesco Panzaa, V. F. (2010). Metabolic Syndrome and Cognitive Impairment: Current Epidemiology and Possible Underlying Mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*, 691–724.
- Francesco Panzaa., V. F. (2010). Síndrome Metabólico y Cognitivo Deterioro: Epidemiología actual y Posibles mecanismos subyacentes.
- González N, M.-V. Z.-B. (2017). Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity and diabetes. *Cardiovascular Diabetology*.
- I. Figueira, G. G. (2017). Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Scientific Reports*.
- Julio César Almanza-Pérez, G. B.-F.-M.-A. (2008). Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Méd Méx* , 535-542.
- K. Yaffe, M., T. Blackwell, M., A.M. Kanaya, M., N. Davidowitz, B., E. Barrett-Connor, M., & and K. Krueger, M. (2004). Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women.
- Katie Wynne, S. S. (2005). Appetite control. *Journal of Endocrinology*, 291–318.
- Khaled A. Alswat, A. K.-t. (2017). Prevalence of Metabolic Syndrome in the Hospitalized Psychiatric Patients. *Medical Archives*, 412-416.
- Knasmüller, T. S. (2018). Gallic acid, a common dietary phenolic protects against high fat diet induced DNA damage. *European Journal of Nutrition*.
- Laura Mellendijk, M. W. (2015). Impact of Nutrition on Cerebral Circulation and Cognition in the Metabolic Syndrome. *Nutrients*.
- Lizarzaburu, J. C. (2013). Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *SciELO Perú*.
- LovicMD, P. B. (2017). Impact of metabolic syndrome on clinical severity and long term prognosis in patients with myocardial infarction with ST segment elevation. *Hellenic Journal of Cardiology*.
- Lueptow., L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J. Vis. Exp.*, 126.
- Mario G. Ferruzzi, J. K.-L. (2009). Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: Implications for treatment in Alzheimer's Disease.
- Mederos Torres C., U. N. (2016). Determinación del factor de riesgo cardiovascular y niveles de adipocinas en jóvenes universitarios con sobrepeso y obesidad. *Revista de la conferencia anual sobre síndrome metabólico.*, 72-73.
- Mendivil, C. O. (2005). Orlistat and Sibutramine in the management of metabolic syndrome. *SciELO*.
- Salem NA, A. N. (2012). Pleiotropic effects of rimonabant and simvastatin on obesity associated multiple metabolic risk factors in rats. *PubMed*.

Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. *The clinical bichemist reviews*, 19.

Xiaoyong Yang, M. D. (2006). Nuclear Receptor Expression Links. *Cell*.

Yaghoob Farbood, A. S. (2013). The effects of gallic acid on pain and memory following transient global ischemia/reperfusion in Wistar rats. *Avicenna J Phytomed*.