



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS BUAP

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

TESIS:

*“EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA
QUE INDUCE LA INYECCIÓN DEL AMILOIDE- β_{1-42} EN EL HIPOCAMPO DE
RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO”*

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN FARMACIA

PRESENTA:

VERÓNICA GUADALUPE GARCÍA GIL

DIRECTORES DE TESIS

Dr. ALFONSO DANIEL DIAZ FONSECA

Dr. SAMUEL TREVIÑO MORA



Índice

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS.....	7
1. Introducción	9
1.1 SÍNDROME METABÓLICO.....	9
1.2 CRITERIOS Y DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME METABÓLICO	10
1.3 Componentes del síndrome metabólico.....	11
1.3.1 Resistencia a la insulina	11
1.3.2 OBESIDAD Y DISLIPIDEMIAS	13
2. Síndrome metabólico y la respuesta inflamatoria	15
2.1 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF-A)	15
2.2 INTERLEUCINA IL-1B	16
3. Síndrome metabólico y el estrés oxidativo	16
3.1 RADICALES LIBRES.	18
4. Síndrome metabólico como una causa de neurodegeneración	18
5. Síndrome metabólico y la enfermedad de alzheimer	18
5.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	18
5.2 HIPOCAMPO	19
5.3 HISTOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD ALZHEIMER	20
6. El amiloide- β y la glucosa, insulina y los lípidos	21
7. Modelos de toxicidad con amiloide- β	23
8. Modelos de dietas hipercalóricas.....	24
9. Justificación	25
10. Objetivos.....	26
11. Desarrollo	27
11.1 DIAGRAMA DE TRABAJO	27
11.2 SUJETOS A EXPERIMENTACIÓN	28
11.3 ADMINISTRACIÓN DE DIETA.....	28
11.4 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA VALORAR LA INDUCCIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO	29
11.5 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	29
11.6 OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS CEREBRALES.....	29



11.7 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS EN LOS TEJIDOS CEREBRALES.....	30
11.7.1 Antioxidantes	30
11.7.2 Cuantificación de nitritos	30
11.7.3 Cuantificación de peroxidación de lípidos	31
11.7.4 Cuantificación de citocinas	31
11.8 Análisis estadísticos.....	32
12. Resultados	32
13. Discusión de resultados	41
14. Conclusiones	45
15. Bibliografía	46



AGRADECIMIENTOS

A la comisión revisora:

Por el tiempo dedicado a la revisión del manuscrito y por las valiosas aportaciones, las cuales contribuyeron a la mejora de la tesis.

Dr. José Albino Moreno Rodríguez

Dra. María de Guadalupe Muñoz arenas

L.F. Juan Carlos Bastida Herrera

A los directores de tesis:

Por la orientación y ayuda que me brindaron para la realización de la tesis.

Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca

Dr. Samuel Treviño Mora



AGRADECIMIENTOS

A Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado apoyo a la alumna con beca para el desarrollo de trabajo de tesis de licenciatura durante un periodo de 6 meses.



Por otra parte agradezco a los Dr. Alfonso Daniel Días Fonseca mi director de tesis por su paciencia, por estar cada momento en la realización de este proyecto, por sus enseñanzas y por haber creído en mí para la realización de esta tesis. Me atrevo a decir que es un gran ser humano, amigo y es un modelo a seguir por la trayectoria y experiencia que tiene. Muchas gracias.

Al Dr. Samuel Treviño Mora que fue un gusto haber trabajado con usted, gracias por su colaboración para la realización de este proyecto, espero que siga apoyando a más estudiantes para lograr esta lucha como estudiante.

Este es mi último trabajo como estudiante, el cual me ha dejado muchas enseñanzas y haber conocido a nuevas personas que me ayudaran en este largo camino. Como todo en esta vida todo tiene un principio y un final. No tengo palabras para describir esta emoción que siento.

Les doy las gracias a mis amigos y colegas que estuvimos siempre juntos estos cinco años y me apoyaron, nunca los olvidare, Ana, Ángeles, Rocío, Liliana, Jessica, Antonio, Erick, Yesenia, Mallely y Julio.



Pero en especial a mi familia que siempre han creído en mí y me daban ánimo para seguir a delante, saben que no soy una mujer expresiva y amorosa quiero que sepan que los quiero mucho. Admiro sus esfuerzos para darnos lo mejor y pronto se los recompensare, gracias por todo los quiero mucho.



ABREVIATURAS

Aβ	Amiloide-beta
Aβ₁₋₄₂	Amiloide beta 1-42
AGL	Ácidos grasos libres
ASB	Albumina sérica de bovino
APP	Proteína precursora del amiloide
APOE	Apolipoproteína E
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca²⁺	Calcio
CxT	Corteza temporal
DHC	Dieta hipercalórica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNC	Dieta normocalórica
EA	Enfermedad de Alzheimer
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GSH	Glutati3n reducido
GSH/GSSG	Glutati3n reducido/oxidado
GSK3β	Gluc3g3eno sintasa quinasa 3 beta
GPx	Glutati3n peroxidasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad



H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
HP	Hipocampo
IDE	Enzima degradadora de insulina
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina-1 beta
IMC	Índice de masa corporal
NO₂⁻	Nitrito
OH⁻	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONNO⁻	Peroxinitrito
O₂⁻	Radical superóxido
RI	Resistencia a la insulina
RHO₂⁻	Radical peroxilo
SM	Síndrome metabólico
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
TG	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteínas de baja densidad



1. Introducción

1.1 Síndrome metabólico

Desde la aparición de los seres vivos, la esperanza de vida se ha modificado con el paso del tiempo. Al principio, los seres humanos eran nómadas y tenían la necesidad de diseñar sus propios utensilios y armas para la búsqueda de alimento mediante la cacería, pesca, la recolección de frutas y semillas. Con el transcurso de los años el hombre aprendió a cultivar y convirtiéndose en agricultor, por consecuencia a esto el hombre se estableció en un solo lugar, formándose así las primeras civilizaciones (*Bonomini y cols., 2015*).

A mediados del siglo XX con la llegada de la industrialización la vida cotidiana de los seres vivos comenzó a modificarse drásticamente, donde las industrias empezaron a fabricar alimentos procesados que contienen azúcar, grasas saturadas y un alto contenido en sodio (*Laclaustra y cols., 2005*). El consumo excesivo de estos alimentos y la falta de actividad física son la consecuencia sobrepeso y la obesidad, el tabaquismo y el estrés cotidiano han originado padecimientos crónico como la obesidad, el incremento de la hipertensión arterial y la diabetes que son el características del síndrome metabólico (*Pasinetti y cols., 2008*).

El síndrome metabólico fue descrito por el Doctor Gerald Reaven en el año 1988, donde describe un conjunto de factores como: la elevación de la presión arterial, resistencia a la insulina, elevación de los triglicéridos y disminución del colesterol de las HDL, que denominó como síndrome X (*Rodríguez y cols., 2002*). El cual consiste la aparición de resistencia a la insulina que constituye el mecanismo fisiopatológico del síndrome metabólico (*Romero, 2006*).

El síndrome metabólico es el conjunto de alteraciones metabólicas, constituido por obesidad, un aumento de la presión arterial, disminución de la concentración de colesterol unido HDL, elevación de la concentración de triglicéridos, hiperglucemia y/o resistencia a la insulina (*Rodarte, 2009*). El síndrome metabólico es un factor para el desarrollo de otras enfermedades como:



DM2, enfermedad cardiovascular, esteatosis hepática, síndrome de ovario poliquístico, gota y apnea del sueño (Rodríguez y cols., 2002).

1.2 Criterios y diagnóstico del síndrome metabólico

En la actualidad, los criterios de diagnóstico más ampliamente utilizados para definir la presencia del síndrome metabólico, son los de la OMS, en 1998 (cuadro 1). La OMS considera que la resistencia a la insulina es un factor predisponente para el síndrome metabólico. Los criterios National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Panel III (ATP III) en el 2001, trata de precisar la prevalencia del síndrome metabólico con una mayor uniformidad (Van y cols, 2015).

Cuadro 1. Criterios de diagnóstico del síndrome metabólico ATP III	
Criterios	Nivel de definición
1. Obesidad	circunferencia cintura
Hombres	> 102 cm
Mujeres	> 88 cm
2. Triglicéridos	≥ 150 mg/dl
3. Colesterol HDL	
Hombres	< 40 mg/dl
Mujeres	< 50 mg/dl
4. Presión arterial	≥ 130/ ≥ 85 mmHg
5. Glucosa en ayuno	≥ 110 mg/dl



1.3 Componentes del síndrome metabólico

1.3.1 Resistencia a la insulina

El páncreas es una glándula de secreción mixta. Tiene un componente exocrino fundamentalmente en la función digestiva. Esta secreción se constituye por diversas enzimas digestivas elaboradas por las células de los islotes pancreáticos. Es vertida al intestino delgado junto con una alta cantidad de bicarbonato al conducto pancreático principal que desemboca en la segunda porción del duodeno. La fusión exocrina es la responsable de la producción del jugo pancreático (*Li y cols., 2015*).

Existe otro componente endocrino del páncreas, las células encargadas de esta función secretan diferentes hormonas al torrente sanguíneo, el páncreas consta de 4 células que son células α , β , δ y F. La secreción de estas células agrupan se en los islotes pancreáticos, de Langerhans (*Pasinetti y cols., 2008*). Se estima que existe alrededor de 2 millones de islotes en el páncreas. En los centros de los islotes, se encuentran las células β , rodeadas por las células F. Las células más abundantes en el páncreas son las células β que constituye el 60%, las células α son el 20%, células δ entre 5% y las células F un 2 % (*Rask y cols., 2012*).

La insulina es secretada por las células β de los islotes pancreáticos. Se sintetiza como una sola cadena polipéptica en el retículo endoplásmico rugoso originando una molécula conocida como pre-proinsulina, cuyo peso molecular es aproximadamente de 11,500 Daltons. La pre-proinsulina es desdoblada en proinsulina por acción enzimática. La proinsulina, con un peso molecular de 9,000 Daltons, es incorporada al aparato de Golgi, la proinsulina queda empaquetada en las vesículas, estas son liberadas, se anclan en el citoesqueleto mediante las proteínas sinapsinas. Las endopeptidasas en la vesícula secretoria efectúan el desdoblamiento de la proinsulina en dos péptidos. Las moléculas resultantes son la insulina y el péptido conector (*De la Monte, 2012*).

La insulina es una hormona que se encarga del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. La insulina es un péptido constituido por dos cadenas: una cadena de 21 aminoácidos y una cadena B de 30 aminoácidos, las cadenas están unidas por dos puentes de disulfuro. Su peso molecular es 5800 Daltons, su vida media es de 5-6 minutos, la degradación de la insulina por insulinasas ubicadas en el hígado y riñón. En casos de insuficiencia renal y hepática los niveles de insulina tienden a aumentar (*Jagua, 2007*).

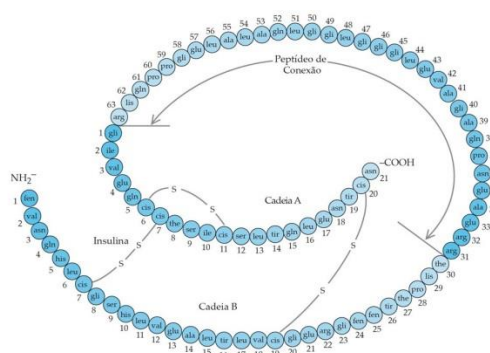


Figura 1. Estructura de la proinsulina tomado de jagua, 2007

La resistencia a la insulina se define como la disminución de la respuesta biológica de los tejidos blancos, principalmente músculo, hígado y tejido adiposo y los efectos biológicos de la hormona (*Bonomini y cols., 2014*). El principal componente al desarrollo de la resistencia a la insulina, es el incremento de los AGL circulantes que se derivan de las reservas de los triglicéridos (*Zamora y cols., 2004*). La resistencia a la insulina está relacionada por efectos de su receptor y los defectos intracelulares posteriores a la estimulación de éste. Se describe en tres puntos importantes:

- 1) Las relacionadas con la actividad del receptor (tirosincinasa y proteincinasa).
- 2) Las involucradas en la cascada de fosforilación y desfosforilación intracelular de la serina, conocidas como MAP-cinasa.



- 3) Las responsables del efecto biológico final de la insulina, que involucra las moléculas transportadoras de glucosa

1.3.2 Obesidad y dislipidemias

El concepto de obesidad de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Tratamiento Integral de la Obesidad (NOM-174-SSA1-1998), es una enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo, es una alteración de evolución crónica y se refleja el aumento de peso provocado por la excesiva acumulación de tejido adiposo en el organismo, consecuencia del equilibrio entre la energía ingerida.

Uno de los parámetros más utilizados para determinar la prevalencia de la obesidad y el sobre peso es el IMC que es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula el peso de una persona en kilos por el cuadrado de la talla en metros (Kg/m^2) (OMS, 2015).

Las instituciones Nacionales de salud de Estados Unidos y la OMS han definido, basándose en el IMC, los criterios de normalidad y obesidad con el objeto de facilitar las comparaciones entre poblaciones y para estudios epidemiológicos (cuadro 2) (Contreras y cols., 2011).

Cuadro 2. Clasificación OMS de acuerdo al IMC	
Categoría	IMC (Kg/m^2)
Peso bajo	< 18.5
Peso normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad (clase 1)	30 – 34.9
Obesidad (clase 2)	35 – 39.9
Obesidad (clase 3)	> 40



La principal alteración metabólica ocasionada por la obesidad es la dislipidemia (*Laclaustra y cols., 2005*). El desarrollo de una dislipidemia es el exceso de los ácidos grasos libres en el hígado ya que éstos estimulan la síntesis de triglicéridos, el ensamblaje y la secreción de lipoproteínas (*Bacardí y cols., 2007*). La dislipidemia se considera una alteración del metabolismo de lípidos, que se caracteriza por hiper-trigliceridemia, hipercolesterolemia y la concentración baja de las partículas HDL-colesterol. Esta alteración metabólica consiste en cambios cualitativos y cuantitativos de las lipoproteínas (*Gutiérrez cols., 2011*). Otra característica importante de la dislipidemia es el aumento de partículas de VLD, el descenso de partículas de HDL y apolipoproteínas B (*Kim y cols., 2014*).

El metabolismo lipídico normal incluye liberación de AGL desde los adipocitos a la sangre circulante, hacia el hígado y el músculo. En el hígado, una parte es oxidada y la mayoría re-esterificada a TG. Hay un transporte continuo de AGL entre tejido adiposo e hígado; sin embargo, si el proceso de re-esterificación se satura, la acumulación de TG puede conducir al hígado graso (*Reitz, 2013*). En presencia de insulinoresistencia y de AGL al hígado produce aumento de la síntesis de TG y de VLDL ricas en TG y apo B. Sin embargo en condiciones normales, la insulina inhibe la secreción de VLDL a la circulación. En el tejido adiposo y en el músculo se produce un descenso de la actividad LPL, por lo que no se aclaran los TG de las VLDL y favorece la acumulación de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y LDL (*Bacardí y cols., 2007*).

Los TG de las VLDL se intercambian con ésteres de colesterol en las HDL por acción de la CETP y la mayoría de dichos ésteres vuelve al hígado en forma de remanentes, una vez que se hidrolizan las VLDL por la lipoproteína lipasa (LPL). Las HDL pequeñas son aclaradas de la circulación con mayor facilidad que sus homólogas, lo que resulta en disminución del HDL y de la apo (*Laclaustra y cols., 2005*). Las LDL pequeñas y densas también son más aterogénicas por ser más tóxicas, por su mayor capacidad de penetración en la íntima y buena adherencia a los glucosaminoglicanos, y por su mayor



susceptibilidad la oxidación y su unión selectiva a los receptores de los macrófagos (*Fischer and Maier, 2015*).

2. Síndrome metabólico y la respuesta inflamatoria

El tejido adiposo es considerado como un órgano pasivo almacenador de energía, que sintetiza un gran número de proteínas de modo parácrino, endocrino, autocrino y controla diversas funciones relacionadas con el metabolismo (*Vega, 2010*). A estas proteínas se les conoce como adipocinas (*Gutierrez, 2011*). Los adipocitos del tejido adiposo producen citocinas pro-inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), interleucinas IL-1 y IL-6 y hormonas como la leptina y adiponectina (*Blancas y cols., 2011*).

2.1 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Ésta fue la primera citocina descubierta que secreta el tejido adiposo y ha sido una de las más estudiadas en el metabolismo. La TNF- α es una proteína proteica con un peso molecular de 17 kDa (*Sharma y cols., 2012*). Es una citosina pro-inflamatoria y es un inhibidor del apetito. Se produce por una gran variedad de células entre las que se encuentran: macrófagos, linfocitos, células endoteliales, miocitos, fibroblastos, células neuronales y adipocitos (*Dijk y cols., 2015*). Es un potente regulador del tejido adiposo, actuando de manera tanto autócrina como parácrina para influenciar una variedad de procesos, incluyendo la apoptosis. Induce la producción de IL-6, que a su vez es el mayor determinante de la respuesta de fase aguda. Su neutralización lleva al incremento de la sensibilidad de insulina en tejidos (*Liu y cols. 2014*). Un mecanismo por el que TNF- α puede contribuir a la resistencia a la insulina es mediante el aumento de ácidos grasos libres en la circulación sanguínea de la lipólisis; sin embargo, y en forma contradictoria se sugiere que aumenta la adipogénesis (*Fischer y cols., 2015*).

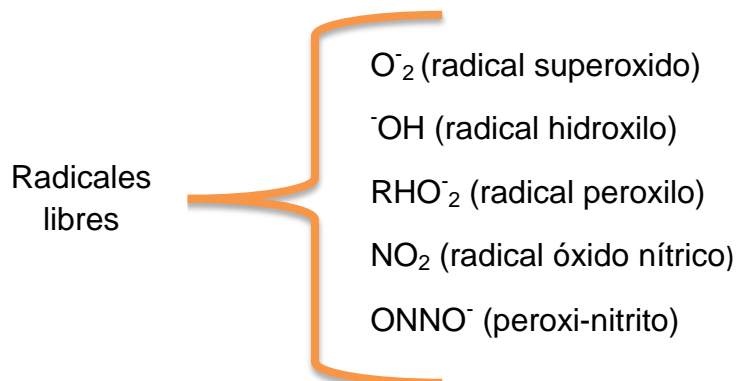
2.2 Interleucina IL-1 β

La IL-1 β es una citosina secretada por adipocitos y macrófagos e incluso musculo esquelético, tiene efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos. Es una citosina que pesa alrededor de 22 a 27 kDa, tiene un receptor similar al receptor de la leptina, y para su función es necesario la dimerización y la unión a su receptor transmembranal (*Dijk y cols., 2015*). La expresión de la IL-1 β es mayor en adipocitos de grasa visceral que en los periféricos, cabe mencionar que el 90% de su síntesis se lleva a cabo en células del tejido adiposo distintas al adipocito. La expresión de IL-1 β es mayor en pacientes obesos, hasta en un 30% del total de la circulante. En estos pacientes, ésta proviene del tejido adiposo (*Liu y cols. 2014*). La IL-1 β aumenta la lipólisis y la oxidación de grasas, ésta también se relaciona con la resistencia a la insulina. Se ha descubierto que la IL-1 β a nivel hepático provoca resistencia a la insulina y posteriormente diabetes.

3. Síndrome metabólico y el estrés oxidativo

3.1 Radicales libres.

Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado, esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas muy reactivas, una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos (*Sánchez y Méndez, 2013*). Los radicales libres más importantes producidos por los sistemas biológicos son:





Los radicales libres se producen continuamente durante el metabolismo celular, que se llevan a cabo principalmente en la mitocondria. Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos sumamente tóxicos para las células (*Manzano y cols., 2006*).

El oxígeno O_2 es un elemento esencial para la vida, pero puede llegar a ser tóxico al formar ERO. Estas son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , como el ozono y el oxígeno en singulete. Otras están parcialmente reducidas como lo es el H_2O_2 , el radical superóxido O_2^- y el radical hidroxilo $\cdot HO$. El O_2 es muy reactivo y con la mayoría de moléculas celulares (*Tangvarasittichai, 2015*). Estas especies reactivas de oxígeno, pueden formar otras de importancia biológica que se combinan ERN, como el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico. En los organismos aerobios, la producción de ERO y ERN se encuentra en equilibrio con los sistemas de defensa antioxidantes. Sin embargo, al romperse este equilibrio las especies reactivas aumentan, se producen daños al ADN, a proteínas y a lípidos, lo que se conoce como estrés oxidativo (*Angoa y Rivas, 2007*).

El estrés oxidativo en el síndrome metabólico desempeña un papel importante en procesos bioquímicos que acompañan al síndrome metabólico. Observaciones experimentales y clínicas indican que el estrés oxidativo es un mecanismo asociada a la obesidad y el desarrollo de diabetes (*Luque y cols., 2014*).

La resistencia a insulina y el estrés oxidativo, las altas concentraciones de H_2O_2 promueven la señalización de insulina e inducir acciones metabólicas típicas de la insulina. Este resultado podría considerarse como la primera documentación en el enlace entre ROS y la insulina. El H_2O_2



utiliza la misma vía de la insulina para la propagación de la señal y producir alteraciones en la liberación de insulina. El H_2O_2 induce un aumento en el consumo de glucosa en los adipocitos y músculos, y también estimula la translocación de GLUT4 y la síntesis de lípidos en adipocitos (*Bonomini y cols., 2014*).

4. Síndrome metabólico como una causa de neurodegeneración

En los últimos años el interés de muchos investigadores se ha centrado en entender las acciones de la insulina sobre el sistema nervioso central (*Choi y cols., 2014*). La insulina modula procesos de homeostasis energética, reproducción, plasticidad sináptica y supervivencia neuronal, razón por la cual se ha propuesto que puede estar implicada en procesos neurodegenerativos. Varios estudios han señalado la importancia de la señalización de insulina en alteraciones como la EA cierta relación entre la resistencia a insulina de la DMT2 y la EA (*Heras y cols. 2009*). Los pacientes con EA presentan características comparables con las encontradas en pacientes con resistencia a insulina y diabetes, como son la elevada concentración de insulina en plasma en condiciones de ayuno y baja concentración de insulina en el líquido cefalorraquídeo, lo que indica alteraciones de la homeostasis hormonal (*Kleinridders y cols., 2014*). Además, los pacientes con DMT2 muestran a su vez algunas deficiencias cognoscitivas (*De la Monte, 2015*).

5. Síndrome metabólico y la enfermedad de Alzheimer

5.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la presencia de deterioro cognitivo y conductual de inicio insidioso y curso progresivo de aparición en la edad adulta, principalmente en la vejez (*Li y cols., 2015*). Actualmente está considerada como la causa más frecuente de demencia neurodegenerativa en los países

desarrollados y su prevalencia se incrementa con la edad (*Watts y cols., 2014*). La atrofia del cerebro en EA es generalmente simétrica y difusa en las circunvalaciones y se evidencia con la disminución de su espesor. Hay aumento de la profundidad de los surcos, dilatación de los ventrículos y reducción del peso y volumen cerebral. La atrofia afecta principalmente al hipocampo, al área transentorrinal, corteza entorrinal adyacente y lóbulos temporales y frontales (Figura 2) (*Johnson cols., 2009*).

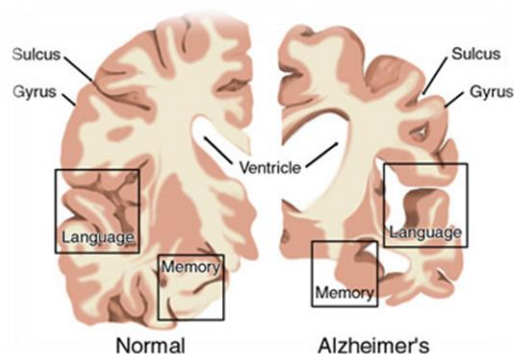


Figura 2. Secciones transversales del cerebro

5.2 Hipocampo

Se han descrito dos grandes regiones en la citoarquitectura cerebral de los seres humanos. La neocorteza o isocorteza, caracterizada por una constitución celular extensa y homogénea. El hipocampo, que es parte de la allocorteza, de menor tamaño que la isocorteza y cuya estructura celular es heterogénea (*Acosta cols., 2012*). El hipocampo se encuentra ubicado en la parte interna del lóbulo temporal (región temporo-mesial) y se divide en dos partes: una anterior, llamada circunvolución del hipocampo (el parahipocampo), y una posterior, llamada lingual. El hipocampo comprende las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 (*Philippi y cols., 2015*). Las zonas que se encuentran incluidas en el área hipocampal son el giro dentado, el subículum, el presubículum, el parasubículum y las cortezas transentorrinal y la adyacente entorrinal (Figura 3). Estas regiones, además de la

amígdala, más que las áreas asociativas de la neocorteza, son las más afectadas en el desarrollo de EA (Acosta cols., 2012).

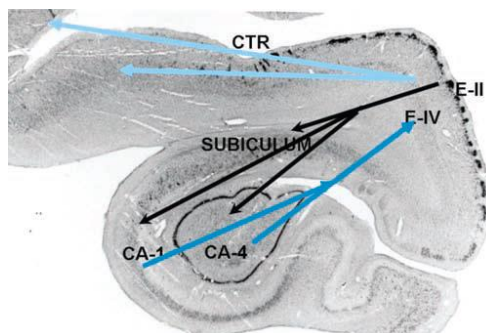


Figura 3. Corte de la región del hipocampo en la enfermedad de Alzheimer

5.3 Histopatología de la enfermedad Alzheimer

El estudio histopatológico *postmortem* de cerebros de pacientes con la EA se caracteriza por la presencia de lesiones en el tejido cerebral son: ovillos neurofibrilares y placas seniles o placas neuríticas.

Las placas seniles o placas neuríticas: Las PN consisten en depósitos extracelulares de fibrillas insolubles formadas de péptido amiloide β ; asociado a estos depósitos se encuentra un componente neurítico de origen dendrítico y axonal. En los cerebros de personas con alzhéimer también se encuentran depósitos solubles no fibrilares de amiloide β , llamados placas seniles, sin neuritas asociadas. Las PN no tienen una distribución topográfica selectiva, sin embargo, su densidad es mayor en las áreas corticales motoras o sensitivas primarias que en las hipocampales. La densidad de las PN en la EA, en general no tiene una buena correlación con la progresión de la demencia y el grado de pérdida neuronal (Acosta y cols., 2012)

Los ovillos neurofibrilares: Los ovillos neurofibrilares están formados por filamentos helicoidales pareados, compuestos principalmente de la proteína asociada a microtúbulos proteína Tau hiperfosforilada de manera anormal. En las



neuronas, Tau normalmente estabiliza los microtúbulos, siendo esencial para el transporte axonal y por ende, para la función neuronal. La agregación de Tau reduce su habilidad para estabilizar los microtúbulos, y llevaría eventualmente a la muerte neuronal). Su aparición es un evento relativamente temprano en la EA (*Bernhardi, 2005*).

Múltiples estudios informan que los pacientes con síndrome metabólico tienen un aumento del riesgo de desarrollar EA en comparación con la edad y el controles emparejados por sexo y evidencia acumulada sugiere EA que está estrechamente relacionada con la disfunción de la insulina tanto de señalización y metabolismo de la glucosa en el cerebro, lo que provocó que algunos investigadores se refieren a EA como la diabetes de tipo 3 (*Jagua y cols., 2007*).

6. El Amiloide- β y la glucosa, insulina y los lípidos

El péptido A β es un producto resultante del catabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP), tras su hidrólisis secuencial por las enzimas β y γ -secretasas. Este procedimiento sucede mayormente a nivel de los endosomas tardíos tras la endocitosis de APP desde la membrana plasmática, donde se localizan normalmente para ejercer su función (*Acosta y cols., 2012*). Existe una vía alternativa no amiloidogénica en la que la enzima α -secretasa hidroliza la APP dentro de la secuencia de aminoácidos correspondientes al péptido A β , impidiendo así su regeneración. La γ -secretasa es en realidad un complejo formado por cuatro proteínas, de las que la proteína con actividad catalítica es la presenilina. En condiciones normales se producen niveles muy bajos, del péptido A β con 40 o 42 aminoácidos dependiendo del sitio de clivaje de la presenilina en el fragmento C-terminal de APP, siendo A β -40 mucho más abundante que A β -42 (*Cerasoli y cols, 2015*). A pesar de solo diferenciarse en dos aminoácidos, ambos péptidos tienen propiedades fisicoquímicas muy distintas. In vitro A β -42 tienen una mayor tendencia a polimerizar, formando oligómeros solubles que a su vez se agregan



un protofibrillas, aun soluble pero ya con la conformación terciaria de hoja- β plegada característica de todos los péptidos amiloide; finalmente estas protofibrillas parecen actuar para la formación de fibras insolubles similares a las presentes en las placas seniles de la EA (*Méndez y cols., 2002*). Se cree que el péptido A β es producido de manera continua y que su agregación y depósitos en la EA es concentración-dependiente. En condiciones normales su concentración parece estar muy estrechamente regulada, existiendo un equilibrio entre su generación y su eliminación por parte de enzimas degradadora como neprilisina, la enzima degradadora de insulina y posiblemente también en la enzima convertidora de la angiotensina I (*Cerasoli y cols, 2015*).

Varios estudios han señalado la importancia de la señalización de insulina en alteraciones como la EA indicando cierta relación entre la resistencia a insulina de la DMT2 y la EA. La señalización de insulina es el A β , el cual compite con la insulina por la unión a la IDE, de manera que altas concentraciones de insulina en la sangre disminuyen la eliminación de A β promoviendo la producción de placas de amiloide (*Kim y cols., 2015*). Así mismo, el A β compite con la insulina por el RI y altera su función al dañar la activación de la MAPK, la proteína cinasa dependiente de calcio calmodulina, Akt, sin embargo no se sabe de qué manera se une el A β al RI y la IDE. La inhibición persistente de estas vías en el cerebro durante el desarrollo de la EA está involucrada en la alteración de la plasticidad sináptica y afecta la arquitectura de las espinas dendríticas. Mientras que el glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3 β) en las neuronal es la responsable del deterioro cognitivo, la hiperfosfoliracion de la tau y el aumento de la producción de A β y la inflamación glial.

La insulina aumenta la captación de lipoproteínas mediada por APOE es una glucoprotiena plasmática implica en el transporte del colesterol y otros lípidos en los diferentes tejidos (*Serrano y cols., 2015*). Es la principal apolipoproteína que se encuentra en el tejido cerebral, preferentemente en el tejido glía pero no en las neuronas, que interviene en el crecimiento y regeneración del

tejido nervioso central durante su desarrollo, así como en el metabolismo del A β , en procesos de aprendizaje y memoria en la sinaptogenesis y en los mecanismos de supervivencia neuronal así como en la regulación del metabolismo lipídico en el cerebro (*Giau y cols., 2015*). En personas con la enfermedad de Alzheimer presentan una frecuencia de 65-80% del alelo $\epsilon 4$. El alelo $\epsilon 4$ está relacionado con un mayor depósito de amiloide en las placas seniles y no se relaciona con la degeneración neurofibrilar y la pérdida neuronal (*Kim y cols., 2014*).

7. Modelos de toxicidad con amiloide- β

Información genética que sirvió de soporte a la hipótesis de la cascada amiloide, permitió la creación de modelos transgénicos en ratón para encontrar respuestas a preguntas esenciales sobre la fisiopatología de la EA. Varias líneas de ratones transgénicos demostraron que la sobreexpresión de APP mutada da lugar al desarrollo de una β -amiloidosis cerebral con placas amiloides muy similares a las de los pacientes con EA, si bien es insuficiente para el desarrollo de ovillos neurifibrilares y muerte neuronal (*Badia y cols., 2006*).

Modelos de ratones transgénicos que sobre-expresan APP normal o las formas mutadas que presentan algunos humanos. La primera se desarrolló en los años 90 y fracasó al generar depósitos A β después de sobre-expresar APP en ratones, probablemente por una expresión transgénica insuficiente o por el background genético de los mismos. En 1995, Games et al. Utilizaron la región promotora del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) para sobre expresar un cDNA minigen de APP con la mutación V717F. Este minigen sobre expresaba las tres isoformas mayores de la APP humana (APP695, 751 y 770) en los ratones (*Manzano y cols., 2009*).

El ratón transgénico generado se llamó PDAPP y mostraba depósitos extracelular de A β , así como placas neuríticas tras 6-9 meses de edad, pérdida sináptica y microgliosis. Se producían acúmulos primariamente de A β 42, aunque

también de A β 40. La distribución de las lesiones en todos los modelos de ratones transgénicos es similar, con un gran número de depósitos marcados en las regiones más afectadas. Existen algunas diferencias como la mayor producción de péptido A β 42 respecto al A β 40 en ratones que expresan la mutación V717F (Pooler y cols., 2015).

8. Modelos de dietas hipercalóricas

Un grupo de investigadores cuantificaron los cambios en los niveles de glucosa cerebral y el estrés oxidativo posterior al consumo de una dieta rica en fructosa en ratas Wistar y por lo tanto, para explorar el potencial de una dieta rica en proteínas de sardina para contrarrestar los efectos de la dieta y el daño del estrés oxidativo. El consumo de pescado ha sido reportado como un factor de protección contra varios tipos de enfermedades y numerosas literaturas han identificado los beneficios del consumo de pescado y su asociación con las enfermedades cardiovasculares en las últimas décadas. Utilizaron un total de 24 ratas de la cepa Wistar machos con un peso de 190-200. Las ratas fueron asignados en 4 grupos con peso igual y alimentados con la siguiente dieta durante 2 meses: Grupo 1 (C-DF) recibió una dieta que contenía 20% de caseína y 64% de fructosa; grupo 2 (S-DF) recibió 20% de proteínas de sardina y el 64% de fructosa; grupo 3 (C) recibió 20% de caseína, 5% de sacarosa y 59% de almidón de maíz; y el grupo 4 (S) recibió proteína sardina 20%, 5% de sacarosa y 59% de almidón de maíz. Las dietas eran isoenergética (16,28 MJ / kg) y contenía cantidades idénticas de lípidos, vitaminas, minerales y fibra. La comida y el agua se proporcionaron ad libitum. Los pesos corporales de los animales se registraron cada semana y la ingesta de alimentos se midió diariamente mediante la medición de la comida restante. La distancia desde la punta de la nariz a la punta de la cola era la medida de la longitud del animal. El valor de IMC se utiliza para identificar la obesidad en las ratas fue de BMI ≥ 1.00 g / cm² (Madani y cols., 2015).



9. Justificación

El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones metabólicas relacionadas por la obesidad, hiperglicemia e insulinoresistencia, lo cual ocasiona el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como la DM2. Por lo tanto, esta situación metabólica se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (*Blázquez y cols., 2014*). Así mismo, los últimos reportes epidemiológicos indican que el síndrome metabólico podría afectar las capacidades cognitivas de los humanos, debido a que la insulinoresistencia y la hiperglicemia en el cerebro activan mecanismos de neurodegeneración a nivel límbico.

En este sentido el síndrome metabólico constituiría un factor de riesgo para desencadenar enfermedades neurodegenerativas como la EA. Un trastorno caracterizado histopatológicamente por la presencia de placas amiloides formadas por el péptido A β , el cual es considerado un agente etiológico importante para esta enfermedad (*Bernhardi y cols., 2005*). Los reportes indican que la síntesis de A β se exagera bajo condiciones de hiperglicemia e hiperinsulinemia, potencializando la formación de las placas amiloides. La insulina en el cerebro juega un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos, el peso corporal, el aprendizaje y la memoria (*Stranahan y cols., 2012*). La disminución en la señalización de insulina se asocia con el deterioro de la capacidad cognitiva, en consecuencia con el desarrollo de la demencia. Esto se debe a que la señalización de la insulina regula múltiples pasos de la síntesis y agregación de A β en el cerebro ocasionando la muerte neuronal, sin embargo esto aún no es claro (*Yang y cols. 2015*).

Hasta el momento no existen informes que describan la relación directa del papel del síndrome metabólico en la toxicidad del A β , en particular sobre las rutas inflamatorias y de estrés oxidativo, las cuales pueden exacerbar la muerte de las neuronas. En este sentido el presente trabajo pretende demostrar el papel de la toxicidad del A β en ratas con síndrome metabólico. Esto con la finalidad de



demostrar si el síndrome metabólico es un factor crítico para incrementar la toxicidad del $A\beta$ y en consecuencia exacerbar el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en regiones límbicas como la corteza temporal y el hipocampo. Este trabajo aportaría evidencias contundentes del riesgo que presentan las personas con síndrome metabólico para desarrollar la EA.

10. Objetivos

Objetivo general

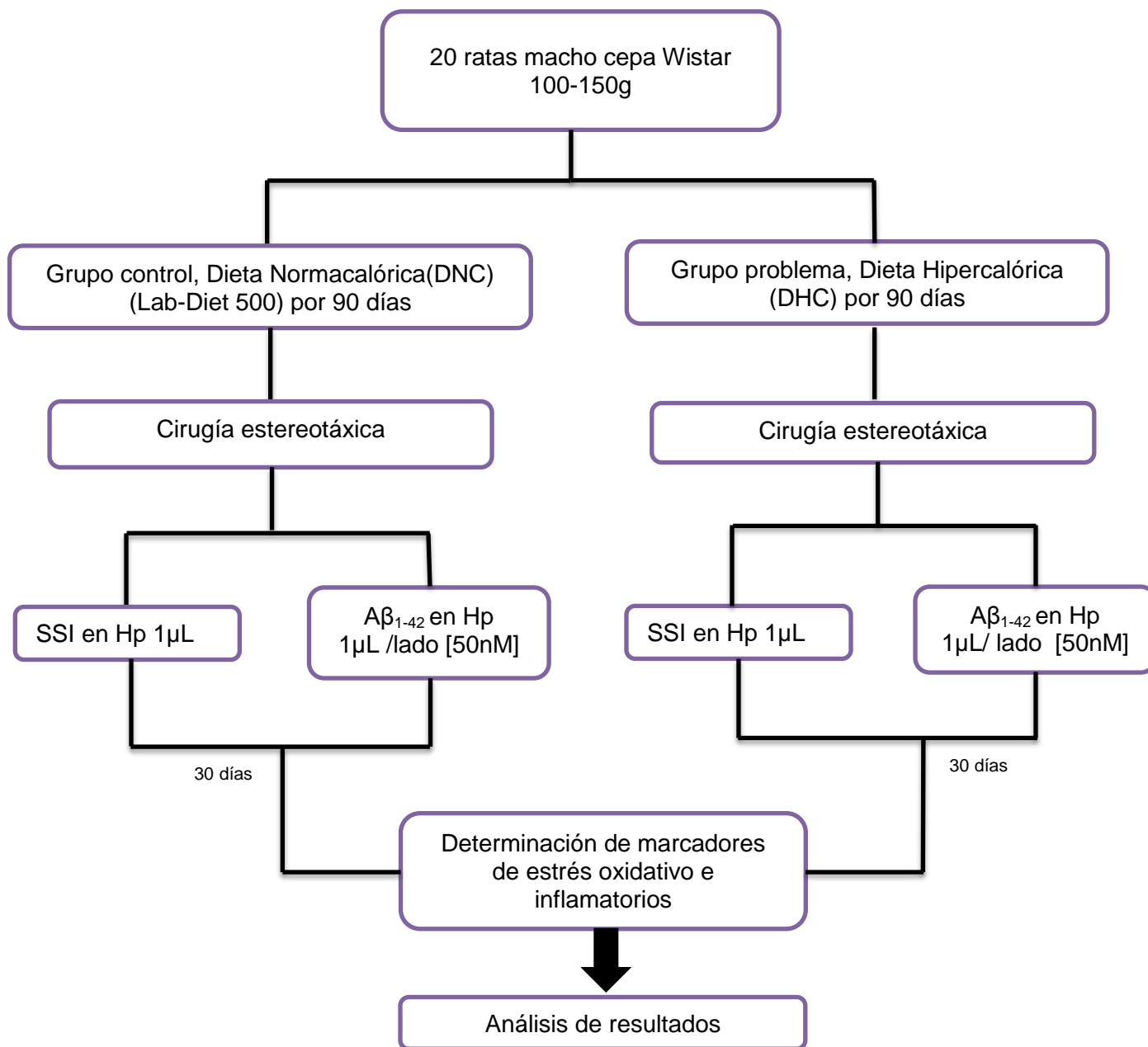
Evaluar el daño oxidativo e inflamatorio que induce el amiloide- β_{1-42} en un modelo de síndrome metabólico en ratas.

Objetivos Particulares

- Evaluar los marcadores de estrés oxidativo que causa el amiloide- β_{1-42} en el hipocampo y la corteza temporal de ratas con síndrome metabólico.
- Evaluar los marcadores de inflamación que causa el amiloide- β_{1-42} en el hipocampo y la corteza temporal de ratas con síndrome metabólico.

11. Desarrollo

11.1 Diagrama de trabajo





11.2 Sujetos a experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 100 a 150 g de peso, procedentes del Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP. Se mantuvieron en jaulas de acrílico transparentes, con libre acceso de agua y alimento, a una temperatura de 24°C, 50% de humedad y un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas. El manejo y cuidado de los animales se realizó bajo los lineamientos en la norma oficial NOM-062-ZOO-1999.

11.3 Administración de Dieta

Los animales empleados fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 10 ratas, el grupo control se mantuvo con una dieta balanceada de aporte energético (LabDiet 5001) y el grupo problema se expuso a una dieta hipercalórica e hiperglicémica (Patente BUAP: MX/E/2013/047377). Las dietas están compuestas de la siguiente manera:

Composición porcentual	Dieta de alta caloría (DHC) (mx/e/2013/047377)(%)	% calorías Kcal/g(DNC) Lab-Diet 5001
Carbohidratos	71.4	56.36
Proteínas	7.3	13.02
Grasa	5.8	27.66
Fibra cruda	0.0	2.95
Total	84.5	99.99

Ambas dietas se administraron *ad libitum* durante 90 días, tiempo necesario para inducir el síndrome metabólico (SM) (Treviño y cols., 2015).

11.4 Determinación de los parámetros bioquímicos para valorar la inducción del síndrome metabólico

A los animales del grupo control y problema se les practicaron las determinaciones séricas en condiciones de ayuno para evaluar la glucosa, insulina, lípidos totales, triglicéridos, ácidos grasos libres a los 0, 30, 60 y 90 días de la administración de las dietas respectivas.

11.5 Cirugía estereotáxica

Una vez generado el síndrome metabólico, los animales del grupo control y problema se sub-dividieron en dos grupos de 10 ratas cada uno, el grupo de solución salina isotónica (SSI) y el grupo de amiloide- β_{1-42} [50 nM]. Los animales fueron anestesiados con ketamina / xilacina (0.2mL/100 g, por vía ip). El amiloide- β_{1-42} (Sigma–Aldrich) [50nM] o la SSI se administraron en el hipocampo (1 μ L de forma bilateral) con ayuda de una aparato estereotáxico (AP: -4.2; L: \pm 2.1; P; 2). Posteriormente, los sujetos de experimentación recibieron los cuidados post-operatorios respectivos. A los 30 días posteriores a la inyección se evaluaron los parámetros de estrés oxidativo y de inflamación respectivamente (n= 5 / grupo).

11.6 Obtención de los tejidos cerebrales

Transcurridos los 30 días de la inyección del amiloide- β_{1-42} , los animales de cada grupo fueron anestesiados con ketamina-xilacina (0.2 mL / 100 g, vía ip.), para ser perfundidos por punción cardiaca con 100 mL de solución buffer de fosfatos (PBS), posteriormente se extrajo el cerebro y se procesó para el desarrollo de las técnicas bioquímicas e histológicas.



11.7 Técnicas bioquímicas en los tejidos cerebrales

Una vez obtenidos los cerebros de cada grupo (n=5), se realizó la disección de la corteza temporal (CxT) y el hipocampo (Hp). Los tejidos fueron homogeneizados en PBS y centrifugados a 12,500 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, en una micro-centrifuga refrigerada.

11.7.1 Antioxidantes

La actividad de enzimas antioxidantes se realizó mediante kits de determinación colorimétrica disponibles comercialmente a partir de los homogenados de la CxT e Hp previamente obtenidos: Superoxido dismutasa (SOD Determination Kit by Fluka Cat:19160), Glutation peroxidasa (Colorimetric assay for GPx Oxford Biomedical Research Product No. FR17), Glutation reducido/oxidado (Colorimetric assay for GSH/GSSG Oxford Biomedical Research Product No. GT30).

11.7.2 Cuantificación de nitritos

La cuantificación se realizó siguiendo el protocolo de Griess modificado por Green y cols., 1982. Los reactivos empleados fueron nitrito de sodio (Meyer) 0.1 μ M (como solución estándar para elaborar una curva de calibración), sulfanilamida (Sigma) al 1 % y de N-(1-naftil)-etilendiamina dihidrocloruro (Sigma-Aldrich) 0.1 % y ácido fosfórico al 5 %. Todos los reactivos y las muestras se adicionaron en volúmenes iguales de 50 μ L. Cada muestra se procesó por triplicado. Los estándares y las muestras fueron leídos en el lector de microplacas a una longitud de onda de 540 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de nitritos. La concentración de nitritos fue obtenida por la interpolación de las lecturas en la curva de calibración. Los datos obtenidos, fueron expresados como micromolar de nitritos por miligramos de proteína (μ M / mg).



11.7.3 Cuantificación de peroxidación de lípidos

La formación de compuestos lipídicos fluorescentes fue medida de acuerdo al protocolo propuesto por Pérez-Severiano y cols., en 2004. El Hp y la CxT de cada grupo, respectivamente, se homogeneizó en SSI. Posteriormente se adicionó una mezcla de cloroformo metanol (1:1, v/v) y colocadas en hielo durante 30 minutos en un cuarto oscuro. Al término del mismo se observó la formación de dos fases, la fase acuosa se decantó y la fase inferior se conservó para que posteriormente sea leída en un espectrofotómetro de luminiscencia (Perkin Elmer LS50-B) a una longitud de onda de 370nm de excitación y 430-nm de emisión. Los datos obtenidos serán expresados en unidades relativas de fluorescencia por miligramo de proteína.

11.7.4 Cuantificación de citocinas

La concentración de IL-1 β y TNF- α en la CxT e Hp de ratas se cuantificó por el método de ELISA (kit, R & D). Se colocaron 100 μ L de la solución fijadora en cada uno de los pozos de la microplaca y se agregaron 10 μ g / μ L de muestra en los pozos. Se incubó durante una hora. Terminado el tiempo de incubación se retiró el líquido residual de cada pozo, para bloquear la reacción se agregaron 300 μ L de ASB durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de la solución fijadora y 100 μ L de cada anticuerpo (anti-IL-1 β y anti-TNF- α , todos a una dilución de 1: 1000). Se incubó durante una hora, después del tiempo transcurrido se retiró el líquido residual y se lavó la placa 2 veces por 5 minutos, se añadieron 100 μ L del anticuerpo secundario se dejó incubar por una hora. Después se lavó la placa 2 veces por 5 minutos, se retiró el líquido residual y se agregaron 100 μ L del sustrato de peroxidasa (ABTS) en cada pozo de la placa. La actividad de la enzima generó la aparición de color azul-verde en los pozos. Finalmente, se agregó 50 μ L de solución de paro para detener la reacción. Los estándares y las muestras fueron leídas en el lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de

citocinas. La concentración de las citocinas fue obtenida mediante la interpolación de las lecturas en la curva de calibración. Los datos obtenidos fueron expresados en picogramos por miligramo de proteína (pg / mg). Los límites de detección de las citocinas, están en el intervalo de 10 a 15 pg / mg de proteína.

11.8 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se graficaron como la media \pm el error estándar (ESM). Posteriormente se analizaron estadísticamente por medio de una prueba de ANOVA de dos vías.

12. Resultados

Efecto del $A\beta_{1-42}$ sobre la concentración de enzimas antioxidantes en la CxT y el Hp en ratas con síndrome metabólico

Para demostrar el papel del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la SOD, CAT, GPx en el Hp y CxT de ratas con síndrome metabólico, se cuantificó la concentración de cada enzima, respectivamente. Los resultados de SOD en CxT demuestran que el grupo tratado con SSI + DNC registró una concentración de 7.8 ± 0.26 unidades de SOD, el grupo tratado con $A\beta_{1-42}$ + DNC obtuvo una concentración de 12.5 ± 2.37 unidades de SOD y el grupo administrado con SSI + DHC mostró una concentración de 2.63 ± 0.35 unidades de SOD. Mientras que el grupo de $A\beta_{1-42}$ + DHC presentó una concentración de 4.73 ± 0.48 unidades de SOD. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró una disminución significativa del 80% en la concentración de SOD, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (Figura 4 A).

De igual manera, la concentración de CAT en la CxT señalan que en el grupo tratado con SSI + DNC presenta una concentración de 0.06 ± 0.002 unidades de CAT, el grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC obtuvo una concentración de 0.16 ± 0.01

unidades de CAT y el grupo administrado con SSI + DHC obtuvo una concentración de 1.86 ± 0.17 unidades de CAT. Mientras que el grupo de $A\beta_{1-42}$ + DHC presentó una concentración de 0.61 ± 0.04 unidades de CAT. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró un aumento significativo del 67% en la concentración de CAT, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (Figura 4 B).

Por otra parte la concentración de GPx en CxT del grupo de SSI + DNC presenta una concentración de 7.23 ± 0.74 μM de GPx, el grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC se observa una concentración de 11.14 ± 0.87 μM de GPx. Mientras el grupo SSI + DHC obtuvo una concentración de 12.62 ± 0.83 μM de GPx y el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC su concentración es 18.12 ± 0.68 μM de GPX. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró un aumento significativo del 43% en la concentración de GPx, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (Figura 4 C).

La concentración de GSH/GSSG en CxT del grupo SSI + DNC corresponde de 3.45 ± 0.67 y el grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC la concentración es de 1.77 ± 0.16 . El grupo SSI + DHC su concentración es de 0.45 ± 0.053 y el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC obtuvo una concentración de 0.44 ± 0.02 . El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró una disminución significativa del 2% en la concentración de GSH/GSSG, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (Figura 4 D).

Asimismo, en el Hp los datos en SOD, la concentración para el grupo SSI + DNC corresponde el 11.13 ± 0.64 unidades de SOD y en el grupo de $A\beta_{1-42}$ + DNC su concentración es de 12.03 ± 2.4 por unidades de SOD. El grupo tratado con SSI + DHC registro una concentración de 8.36 ± 0.84 por unidades de SOD y el grupo tratado con $A\beta_{1-42}$ + DHC obtuvo una concentración de 5.32 ± 1 por unidades de SOD. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró



una disminución significativa del 36% en la concentración de SOD, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (Figura 5 A).

La concentración CAT en Hp del grupo SSI + DNC es de 0.08 ± 0.01 por unidades de CAT y el grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC presenta una concentración de 0.11 ± 0.01 unidades de CAT. Mientras tanto el grupo SSI + DNC se observó una concentración de 0.27 ± 0.02 unidades de CAT, el grupo con $A\beta_{1-42}$ + DHC mostro una concentración de 0.15 ± 0.08 unidades de CAT. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró un aumento significativo del 36% en la concentración de CAT, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (figura 5 B).

En el caso de GPx en Hp la concentración del grupo SSI + DNC fue 5.09 ± 0.66 μ M de GPx, para el grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC la concentración es de 8.89 ± 0.61 μ M de GPx. Para el grupo tratado con SSI + DHC su concentración es de 7.8 ± 0.17 , $A\beta_{1-42}$ + DHC la concentración fue de 10.55 ± 1.02 . El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró un aumento significativo del 35% en la concentración de GPx, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (figura 5 C).

Las concentración GSH/GSSG en Hp del grupo con SSI + DNC mostró una concentración del 2.5 ± 0.18 y el grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC registró una concentración de 0.76 ± 0.89 . El grupo SSI + DHC su concentración fue de 0.68 ± 0.056 y $A\beta_{1-42}$ + DHC es 0.33 ± 0.05 . El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró una disminución significativa del 51% en la concentración de GPx, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (figura 5 D).

CORTEZA TEMPORAL

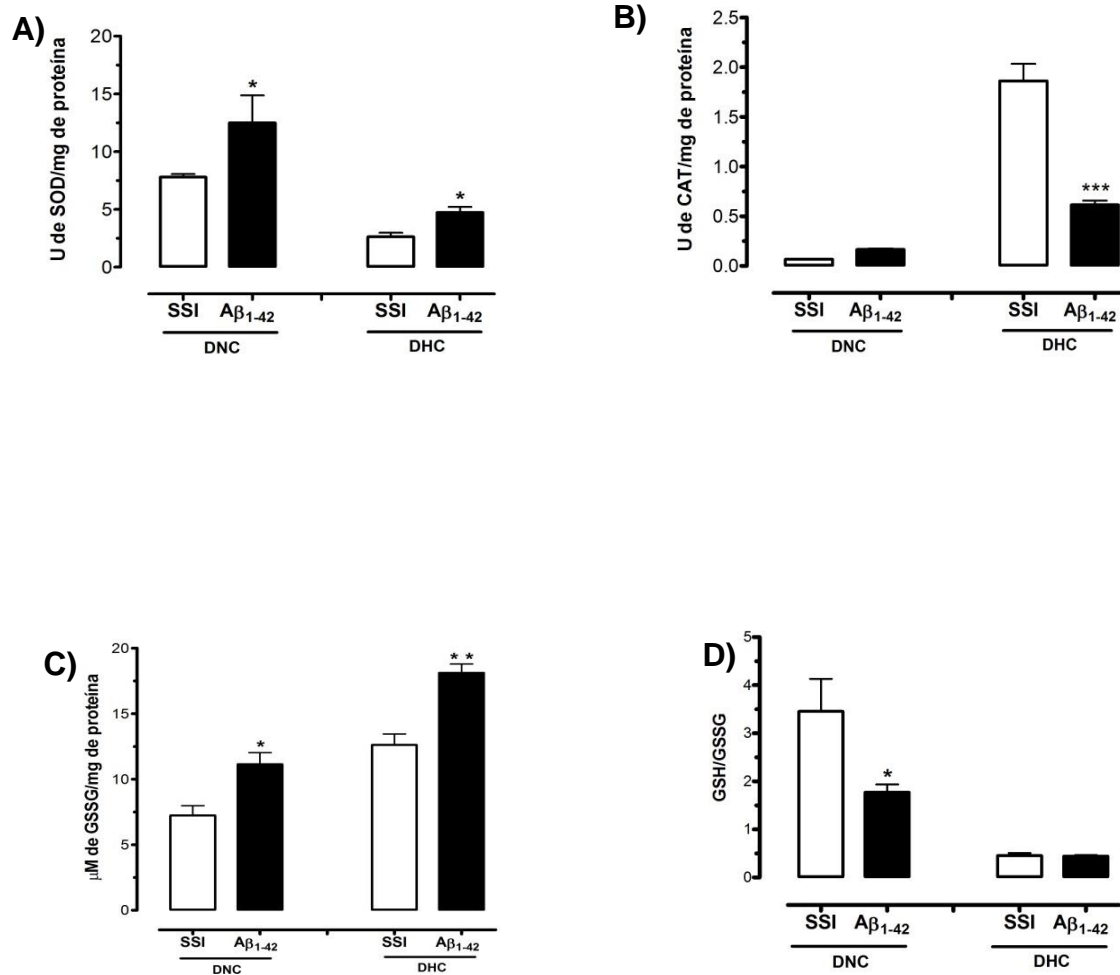


Figura 4. Efecto del Aβ₁₋₄₂ sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico. Los datos graficados corresponden a la media ± ESM de las enzimas antioxidantes (ANOVA de dos vías).

HIPOCAMPO

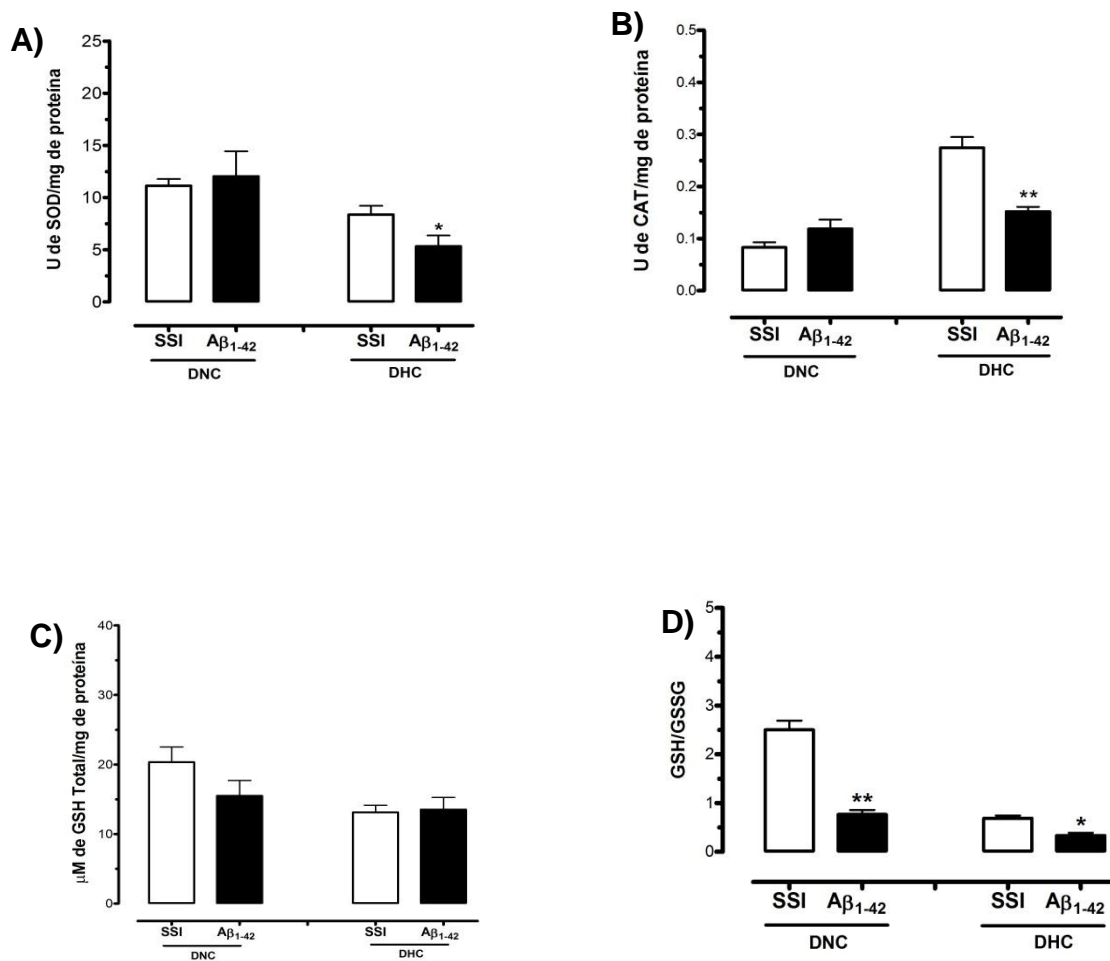


Figura 5. Efecto del A β_{1-42} sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico. Los datos graficados corresponden a la media \pm ESM de las enzimas antioxidantes (ANOVA de dos vías).

Efecto del $A\beta_{1-42}$ sobre el estrés oxidativo en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico

Las concentraciones de nitritos en la región CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico se cuantificó por medio de la técnica de Griess. La concentración de nitritos en la región CxT en el grupo tratado con SSI + DNC es de $2.94 \pm 0.72 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas y el grupo tratado por $A\beta_{1-42}$ + DNC registro una concentración de $9.10 \pm 0.71 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas, en el grupo tratado con SSI + DHC la concentración es de $7.45 \pm 0.90 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas y $A\beta_{1-42}$ + DHC obtuvo una concentración de $11.97 \pm 1.02 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostro un aumento significativo del 60% en la concentración de nitritos, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vía) (figura 6 A).

Mientras la concentración de nitritos en Hp la concentración en el grupo de SSI + DNC obtuvo $5.07 \pm 0.35 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas, el grupo tratado por $A\beta_{1-42}$ + DNC la concentración fue de $9.13 \pm 0.75 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas. El grupo SSI + DHC registró una concentración de $8.09 \pm 0.69 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas y el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC presentó una concentración de $13.20 \pm 1.33 \mu\text{M}$ de nitritos/ mg de proteínas. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró un aumento significativo del 63% en la concentración de nitritos, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (figura 6 B).

CORTEZA TEMPORAL

HIPOCAMPO

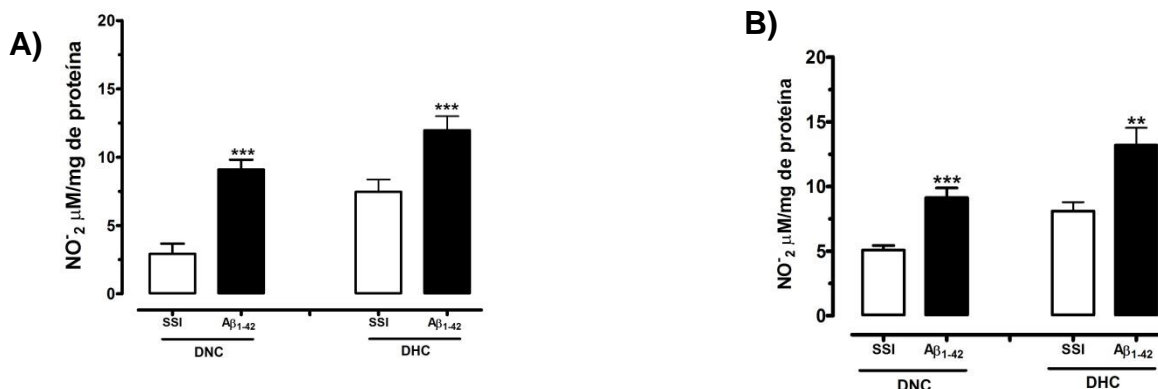


Figura 6. Efecto del Aβ₁₋₄₂ causa un estrés oxidativo en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico. Los animales fueron sacrificados 30 días después de la inyección de 1 μL de SSI o μL de Aβ₁₋₄₂ [50 nM] en el Hp. En a y b se graficó la concentración de nitritos. Las barras representa la media ± el ESM.

Efecto del Aβ₁₋₄₂ sobre la peroxidación de lípidos actividad en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico.

La concentración de peroxidación de lípidos en CxT del grupo con SSI + DNC presento una concentración de 0.06 ± 0.009 URF/ mg de proteínas y el otro grupo tratado Aβ₁₋₄₂ + DNC registró una concentración de 0.34 ± 0.067 URF/ mg de proteínas. El SSI + DHC su concentración fue de 0.25 ± 0.03 URF/ mg de proteínas y Aβ₁₋₄₂ + DHC obtuvo una concentración de 0.42 ± 0.01 URF/ mg de proteínas. El análisis estadístico indicó que el grupo Aβ₁₋₄₂ + DHC mostró un aumento significativo del 68% en la concentración de peroxidación de lípidos, respecto al grupo Aβ₁₋₄₂ + DNC (ANOVA de dos vías) (figura 7 A).

Así mismo la concentración de peroxidación de lípidos en Hp en el grupo SS + DNC su concentración es de 0.07 ± 0.01 URF/ mg de proteínas y el grupo Aβ₁₋₄₂ + DNC obtuvo una concentración de 0.22 ± 0.02 μM de nitritos/ mg de proteínas. El grupo SSI + DHC registró una concentración de 0.37 ± 0.36 URF/ mg de proteínas, el grupo tratado con Aβ₁₋₄₂ + DHC la concentración es de 0.55 ± 0.04

URF/ mg de proteínas. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC mostró un aumento significativo del 48% en la concentración de peroxidación de lípidos, respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC (ANOVA de dos vías) (figura 7 B).

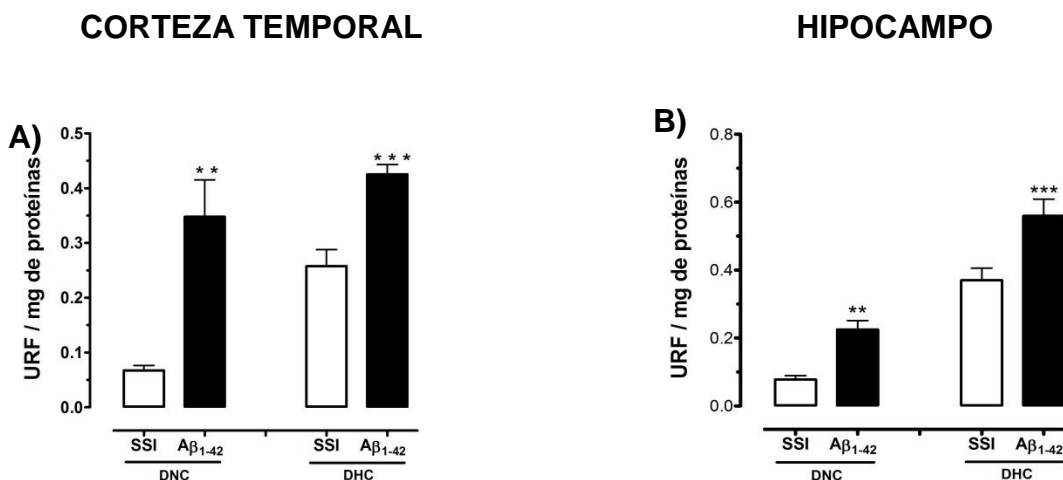


Figura 7. Efecto del $A\beta_{1-42}$ sobre la peroxidación de lípidos actividad en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico. Los animales fueron inyectados con 1 μ L de SSI o 1 μ L de $A\beta_{1-42}$ [50 nM] en el Hp. En la gráfica A se muestra la concentración de LP en CxT y en B se muestra la concentración de LP en HP. Cada barra representa la media \pm el ESM.

Papel del $A\beta_{1-42}$ sobre la concentración de IL-1 β y TNF- α en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico

La concentración de citocinas (IL-1 β y TNF- α) se cuantificó en la región CxT y HP por la técnica de ELISA. En la CxT la concentración de IL-1 β y TNF- α en el grupo SSI + DNC fue de 17.91 ± 1.43 Pg de IL-1 β / mg de proteína y 19.45 ± 2.78 Pg de TNF α / mg de proteína, el grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC registró una concentración de 172.6 ± 14.36 pg de IL-1 β / mg de proteína y 124.9 ± 3.18 Pg de TNF α / mg de proteína, para el segundo grupo tratado SSI + DHC las concentraciones fueron 68.62 ± 3.27 Pg de IL-1 β / mg de proteína y 45.75 ± 3.55 Pg de IL-1 β / mg de proteína para el grupo tratado con $A\beta_{1-42}$ + DHC se obtuvo los siguientes datos 191.3 ± 2.16 Pg de IL-1 β / mg de proteína y 176.3 ± 14.86 Pg de IL-1 β / mg de



proteína. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC (IL-1 β y TNF- α) mostró un aumento significativo del 178% 285% en la concentración de IL-1 β y TNF- α , respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC, el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC aumento (ANOVA de dos vías) (Figura 8 A y C).

El Hp las concentraciones de citocinas (IL-1 β y TNF- α) en el grupo SSI + DNC se obtuvieron los siguientes datos 29.4 ± 3.07 Pg de IL-1 β / mg de proteína y 5.37 ± 0.51 Pg de IL-1 β / mg de proteína, $A\beta_{1-42}$ + DNC presentó las siguiente concentración 125 ± 2.52 Pg de IL-1 β / mg de proteína y 74.20 ± 3.15 Pg de IL-1 β / mg de proteína, SSI + DHC registró las concentraciones de 59.05 ± 4.65 Pg de IL-1 β / mg de proteína y 31.07 ± 1.25 Pg de IL-1 β / mg de proteína y el grupo tratado con $A\beta_{1-42}$ + DHC registró una concentración de 185.8 ± 44.55 Pg de IL-1 β / mg de proteína y 100.9 ± 2.32 Pg de IL-1 β / mg de proteína. El análisis estadístico indicó que el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC (IL-1 β y TNF- α) mostró un aumento significativo del 214% 224% en la concentración de IL-1 β y TNF- α , respecto al grupo $A\beta_{1-42}$ + DNC, el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC aumentó (ANOVA de dos vías) (Figura 8 B y D).

CORTEZA TEMPORAL

HIPOCAMPO

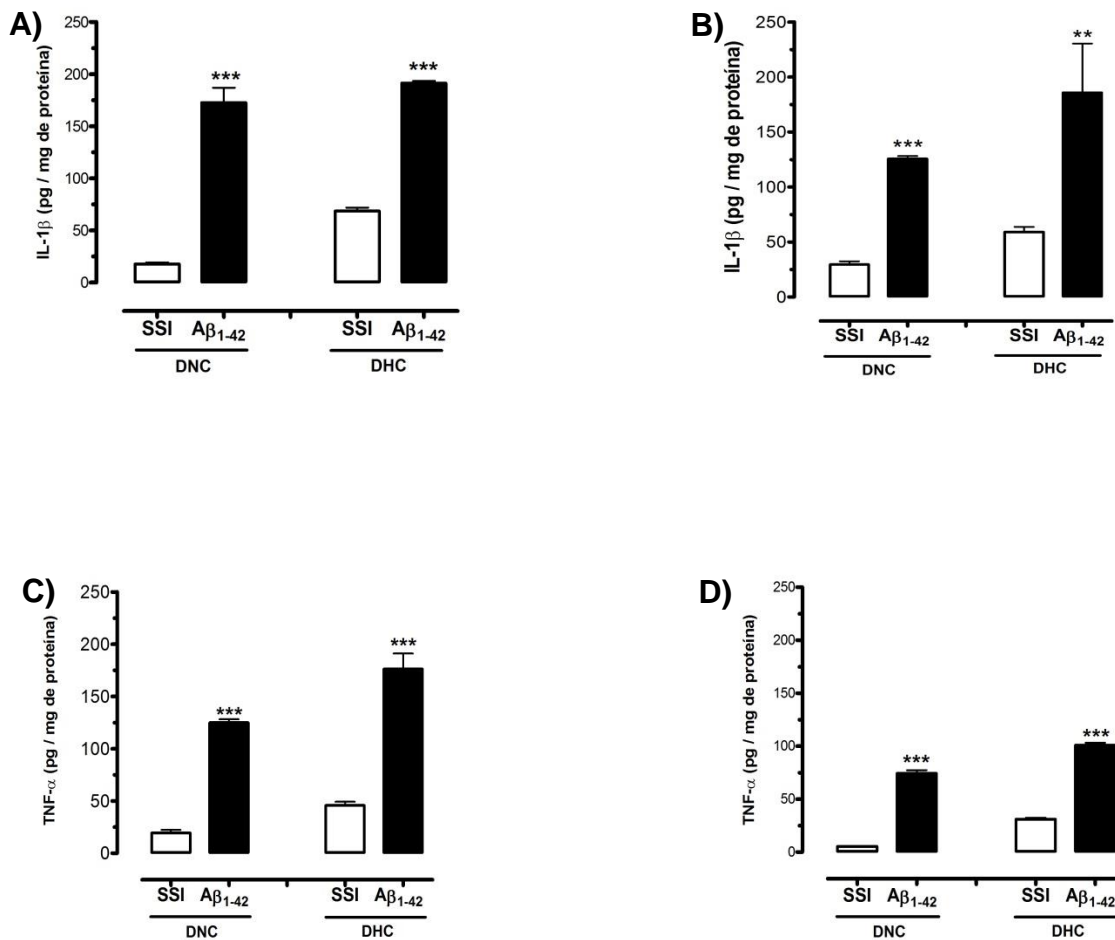


Figura 8. Efecto del A β_{1-42} incrementa la concentración de citosinas pro-inflamatoria en la CxT y el Hp de ratas con síndrome metabólico. Los animales fueron inyectados con 1 μ L de SSI o 1 μ L de A β_{1-42} [50 nM] en el Hp. En la gráfica A, C se muestra la concentración de IL-1 β y TNF- α en CxT. Las gráficas B, D se muestra la concentración de IL-1 β y TNF- α en HP. Las citosinas fueron cuantificadas por la técnica de Elisa. Cada barra representa la media \pm el ESM.

13. Discusión de resultados

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en el Hp y CxT que induce la inyección del A β_{1-42} en ratas con síndrome metabólico. La EA es la demencia más común en personas de la tercera edad, se caracteriza por una pérdida progresiva de la capacidad cognitiva



y una neurodegeneración severa (*Zhiyou y cols., 2013*). La pérdida neuronal y la atrofia cerebral han sido reportadas en las regiones del hipocampo, la corteza temporal y frontal en personas con la EA. Con respecto a la EA, la muerte neuronal es inducida por los efectos tóxicos del A β , generándose así estrés oxidativo (*Parris y cols., 2005*). El cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidativo ya que presenta una elevada tasa metabólica derivada de la glucosa, posee niveles muy bajos de defensas antioxidantes, contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, que es un posible blanco de peroxidación lipídica y además una alta actividad enzimática relacionada con metales de transición, los cuales pueden catalizar la formación de radicales libres (*Manzano y cols., 2006*). Existen varios sistemas de protección en la célula que evitan el excesivo incremento de especies reactivas, entre los que se encuentran: la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (*Ilkun y Boudina, 2008*). Estudios recientes han demostrado que la concentración de estas enzimas se encuentra en mayor concentración en personas que padecen la EA (*Ya-Ting Chang y cols, 2014*). En el presente trabajo se evaluaron los niveles de las enzimas antioxidantes en la región del Hp y CxT, que son clave esencial para la defensa ante el estrés oxidativo. Los datos observados en SOD se muestran una disminución significativa en el grupo tratado con A β ₁₋₄₂ + DHC respecto al grupo con SSI + DNC, por otra parte las enzimas CAT, GPx y GSH/GSSG hay un aumento significativo en el grupo con la A β ₁₋₄₂ + DHC en comparación con el grupo SSI+ DNC. Por lo que se sugiere que el A β bajo condiciones de SM se induce un aumento en las enzimas SOD y GPx debido a los niveles de H₂O₂ lo que activa dichas enzimas (*Gil Alcides y cols., 2013*). Cuando los mecanismos antioxidantes son insuficientes para contener a los radicales libres derivados del oxígeno o nitrógeno, se da lugar a una condición conocida como estrés oxidativo y nitrosativo, que puede ser de tal magnitud que termine por afectar las funciones principales de la célula e inducir su muerte (*Hritcu y cols., 2015*).



La peroxidación lipídica es una de las principales consecuencias del estrés oxidativo causando un algún estímulo externo en el cerebro. Se produce una pérdida progresiva de la fluidez de la membrana, se reduce el potencial de membrana y hay un aumento en la permeabilidad de iones como Ca_{2+} (DiCiero y cols., 2000). La peroxidación lipídica conduce a la producción de hidroperóxidos de dieno conjugado y sustancias inestables que se desintegran en varios aldehídos como malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (4HNE) (Ya-Ting Chang y cols., 2014). Los resultados obtenidos de la cuantificación de la concentración de la peroxidación lipídica en la regiones de Hp y CxT, se observa un aumento significativo en el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC respecto al grupo con SSI + DNC. Por lo que se sugiere que el $A\beta_{1-42}$ bajo condiciones de SM, conduce a la aparición del estrés oxidativo, por consecuencia los ácidos poliinsaturados que se encuentran en la membranas biológicas sean vulnerables a la oxidación debidos a que tienen en sus estructura dobles enlaces, lo que hace que sean extremadamente sensibles a la agresión de los radicales libres y finalmente muerte celular.

El estrés oxidativo (EO) y la apoptosis tienen un función muy importante en la patogénesis de la EA. El incremento del calcio intracelular genera la activación de la óxido nítrico sintetasa neuronal (NOS-n), lo que a su vez aumenta la concentración del NO intracelular. Éste reacciona con el anión radical superóxido que proviene de la cascada del ácido araquidónico, de la mitocondria o de la conversión de la xantina deshidrogenada xantina oxidasa, dando lugar al peroxinitrito ($ONOO^-$) (Manzano y cols., 2006). Este compuesto puede originar formas transicionales activas con potenciales reactivos semejantes a los del radical hidroxilo. La demostración de la peroxinitración extensiva de proteínas en el cerebro afectado por la EA, sugiere un papel patológico del $ONOO^-$ en esta enfermedad (Hernández y cols., 2014). Los resultados obtenidos de la cuantificación de la concentración de nitritos en la regiones de Hp y CxT, se observa un aumento significativo en el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC respecto al grupo con SSI + DNC. Por lo que se sugiere que el $A\beta_{1-42}$ bajo condiciones de SM, la estructura y función en la mayoría de las células de la CxT y el Hp, lo que implica



el evidente estado de neurodegeneración que a largo plazo podría afectar las funciones cognitivas.

En la EA hay una respuesta inflamatoria que se presenta como respuesta al estrés crónico producido por los depósitos de $A\beta$ (León y cols., 2006). Este proceso se caracteriza por la inducción de una cascada de eventos moleculares que incluyen la activación de la microglia y los astrocitos y secreción de citocinas. La glía que rodea las placas amiloideas o la que es expuesta a $A\beta$, secreta moléculas pro-inflamatorias incluyendo Factor de Necrosis Tumoral- α , (TNF- α), IL-1 β (Dra. Rbernhardi, 2007). Estas moléculas pueden potenciar la neurodegeneración al aumentar la sensibilidad neuronal a los radicales libres. La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) aumenta en la neuroinflamación y está elevada en la EA. Además de su citotoxicidad, TNF- α e IL-1 β también estimulan la síntesis y procesamiento amiloidogénico del APP (Manzano y cols., 2006). Los resultados obtenidos de la cuantificación de la concentración de citocinas en la regiones de Hp y CxT, se observa un aumento significativo en el grupo $A\beta_{1-42}$ + DHC respecto al grupo con SSI + DNC. Por lo que se sugiere que el $A\beta_{1-42}$ bajo condiciones de SM, las citocinas afectan la regulación sináptica y sus efectos son variables dependiendo de la concentración de citocinas. Mientras IL-1 β participa en mecanismos de memoria en condiciones fisiológicas, a concentraciones elevadas altera la memoria y la plasticidad neuronal, induciendo depresión sináptica.

Por lo tanto, los resultados del presente trabajo aportan las primeras evidencias del impacto del síndrome metabólico en la toxicidad del $A\beta$ a nivel cerebral. Una toxicidad expresada por la generación de radicales libres, los cuales desencadenan una cascada oxidativa que repercuten en la activación de células inmunitarias para la generación de una respuesta inflamatoria que podría resultar en una degeneración neuronal.



14. Conclusiones

- El $A\beta_{1-42}$ modifican la concentración de las enzimas antioxidantes e incrementa la concentración de nitritos, radicales libres y la peroxidación de lípidos detonando el estrés oxidativo en el hipocampo y la corteza temporal de ratas con síndrome metabólico.
- El $A\beta_{1-42}$ incrementa la concentración de la IL-1 β y TNF- α , las cuales favorecen el desarrollo de una respuesta inflamatoria en el hipocampo y la corteza temporal de ratas con síndrome metabólico.
- La condición de síndrome metabólico en las ratas potencializa la respuesta oxidativa e inflamatoria que induce el $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo y la corteza temporal de ratas.

8. Bibliografía

Jagua A, Marín RA, Granados LA, Ávila V. (2008). Insulina Cerebral. *Colombia Médica*. 38(1): 107-116.

Giau V, Bagyinszky, Kim S. (2015). Role of Apolipoprotein E in Neurodegenerative Diseases. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 11: 1723–1737.

Kim J, Yoon H, Basak J, Kim J. (2014). Apolipoprotein E in Synaptic Plasticity and Alzheimer's Disease: Potential Cellular and Molecular Mechanisms. *Molecules and Cells*. 37(11): 767-776.

Serrano A, Qian J, Monsell SE, Betensky RA, Hyman BT.(2015). *APOE* ϵ 2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 77(6): 917–929.

Rodríguez AL, Sánchez M, Martínez L. (2002). Síndrome Metabólico. *Revista Cubana Endocrinol*. 13(3):238-252.



Pineda CA. (2008). Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. *Colombia Médica*. 39 (1): 96-106.

Cai D, Liu T. (2012). Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- κ B. *Aging*. 4(2): 98-115.

García JA, Alemán JI. (2014). Síndrome Metabólico: una epidemia en la actualidad. *Medical Honduras*. 82(3): 121-125.

Rodarte N. (2009). Epidemiología del síndrome metabólico. *Gaceta Médica de México*. 145(5): 384-391.

Kim B, Feldman EL. (2014). Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. *Experimental and Molecular Medicine*. 47: 1-10.

González A, Simental L, Elizondo S, Sánchez J, Gutiérrez G, Guerrero F. (2008). Prevalencia del síndrome metabólico entre adultos mexicanos no diabéticos, usando las definiciones de la OMS, NCEP-ATPIIIa e IDF. *Médica del Hospital General de México*, 71(1): 11-19.

Bacardí M, Jiménez A, Jones E, Guzmán V. (2007). Alta prevalencia de obesidad y obesidad abdominal en niños escolares entre 6 y 12 años de edad. *Boletín Médico Hospital Infantil de México*. 64: 362-369.

Gutiérrez J, Velázquez M, Prieto B. (2011). El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. *Endocrinología y Nutrición*. 19(4):154-162.

Vega GB. (2010). El adipocito y la respuesta inmune. *Facultad de medicina de la UMAN*. 53(1): 43-45.

Blancas FG, Almanza PJC, López RRI, Alarcón AFJ, García MR, Cruz M. (2010). La obesidad como un proceso inflamatorio. *Boletín Médico Hospital Infantil de México*. 67: 88-97.



Sharma V, Thakur V, Nath S, Guleria R. (2011). Tumor Necrosis Factor and Alzheimer's Disease: A Cause and Consequence Relationship. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*. 22(1):86-97.

Dijk G, Heijningen S, Reijne A, Nyakas C, Van der Zee EA, Eisel U. Integrative neurobiology of metabolic diseases, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Frontiers Neuroscience*. 9(173): 1-19.

Liu L, Chan C. (2014). The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing*. 1-26.

Fischer R, Maier O. (2015). Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. *Oxid Med Cell Longev*. 1-18.

Tangvarasittichai S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 6(3): 456-480.

Angoa M, Selva A. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. *Archives Neuroscience*. 12(1): 45-54.

Sánchez V, Méndez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Investigaciones Médicas Sur de México*. 20(3): 161-168.

Manzano N, Mas J. (2006). Estrés oxidativo, péptido β -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gaceta Médica México*. 142(3): 229-238.

Bonomini F, Fabrizio L, Rezzani R. (2014). Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging and Disease*. 6(2): 109-119.

Jagua A, Ávila. (2007). Insulina y enfermedad de alzheimer: una diabetes tipo 3. *Facultad de Medicina de la Universidad nacional de Colombia*. 55(1): 66-70



Choi J, Chandrasekaran K, Demarest T, Kristian T, Vijaykumar K, Dsouza K, Yarowsky P, Gallipoli R, Koch L, Fiskum G, Britton S, Russell J. (2014). Brain diabetic neurodegeneration segregates with low intrinsic aerobic capacity. *Ann Clin Transl Neurol.* (8): 589–604.

Heras D, Arias C. (2009). Señalización por insulina en el cerebro y su participación en la enfermedad de Alzheimer. *Gaceta Médica México.* 4(3):117-125.

Kleinridders A, Ferris H, Ca Wi, Kahn R. (2014). Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *American Diabetes Association.* 63(7): 2232–2243.

De la Monte S M. (2015). Contributions of Brain Insulin Resistance and Deficiency in Amyloid-Related Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Author manuscript.* 72(1): 49–66.

Badía MC, Alcañiz AL, Ortega A, Morab N, Alonso MD, Ribesb J. (2006). Estudio de toxicidad del péptido beta-amiloide en linfocitos humanos. *Geriatr Gerontol.* 41(3):178-82.

Manzano S, González JL, Marcos A, Payno M, Villanueva C, Matías-Guiu J. (2009). Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. *Neurociencias.* 24(4):255-262.

Pooler A, Polydoro M, Maury e, Nicholls S, Reddy S, Wegmann S, William C, Saqran L, Cagsal-Getkin O, Pitstick R, Beier D, Carlson G, Spires-Jones T, Hyman B. (2015). Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications.* 3(14): 1-11.

Madani Z, Malaisse WJ, Ait-Yahia D. (2015). A comparison between the impact of two types of dietary protein on brain glucose concentrations and oxidative stress in high fructose-induced metabolic syndrome rats. *Biomedical Reports* 3: 731-735.



Li X, Song D, Leng S. (2015). Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clinical Interventions in Aging*. 10: 549–560.

Yang H, Kwon D, Kim M, Kang S, Moon N, Daily J, Park S. (2015). Red peppers with moderate and severe pungency prevent the memory deficit and hepatic insulin resistance in diabetic rats with Alzheimer's disease. *Nutrition and Metabolism* 12(9): 1-12.

Blázquez E, Velázquez E, Hurtado V, Ruiz JM. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in Endocrinology*. 5(161): 1-21.

Stranahana A, Mattson M. (2015). Metabolic reserve as a determinant of cognitive aging. *Author manuscript*. 30(2): 1-14.

Bernhardi M. R. (2005). Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Neuropsiquiatria*. 43(2): 123-132.

Kim B, Feldman E. (2015). Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. *Experimental and Molecular Medicine*. 49:1-10.

Johnson, Schmitz T, Moritz C, Meyerand M, Rowley H, Hansen K, Gleason C, Carlsson C, Ries, Asthana M, Chen K, Reiman E. (2009). Activation of Brain Regions Vulnerable to Alzheimer's Disease: The Effect of Mild Cognitive Impairment. *Neurobiol Aging*. 27(11): 1604–1612.

Watts A, Loskutova N, Burns J, Johnson D. (2014). Metabolic Syndrome and Cognitive Decline in Early Alzheimer's Disease and Healthy Older Adults. *Author manuscript*. 35(2): 253–265.

Cerasoli E, Ryadno M, Austen B. (2015). The elusive nature and diagnostics of misfolded A β oligomers. *Frontiers in Chemistry*. 3(17): 1-6.



Menéndez S, Pérez N, Rodríguez J. (2002). Péptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de alzheimer. *Cubana Investigacion Biomedica*. 21(4):253-261.

Philippi N, Botzung A, Noblet V, Rousseau F, Després O, Cretin B, Kremer S, Blanc F, Manning L. (2015). Impaired emotional autobiographical memory associated with right amygdalar-hippocampal atrophy in Alzheimer's disease patients. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 7(21): 1-10.

Domínguez V, Huitrón G, Mendoza A. (2011). La reacción inflamatoria en la fisiopatogenia de la obesidad. *Clencia ergo sum* 19(1): 75-82.

Contreras E, Santiago J. (2011). Obesidad, síndrome metabólico y su impacto en las enfermedades cardiovasculares. *Biomédica*. 22:103-115.

Zamora D, Chávez NC, Méndez N. (2004). Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Médica sur*. 11(3):1-12.

Bastianetto S, Zheng W, Quirion R. (2000). Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *British Journal of Pharmacology*. 131(4):711-720.

DiCiero M, Bruin V, Vale M. (2000). Lipid Peroxidation and Nitrite plus Nitrate Levels in Brain Tissue from Patients with Alzheimer's Disease. *Gerontology*. 46:179–184.

Chang Y, Chang W, Tsai N, Huang C, Kung C, Su Y, Lin W, Cheng B, Su C, Chiang Y, Lu C. (2014). The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Bio Med Research International*.1-14.

Reitz C. (2003). Dyslipidemia and dementia: current epidemiology, genetic evidence and mechanisms behind the associations. *Author Manuscript*. 1-26



Reddy V, Zhu X, Perry G, Smith G. (2009). Oxidative Stress in Diabetes and Alzheimer's Disease. *Author Manuscript*. 16(4): 763–774.

Austin S, Santhanam A, Hinton D, Choi D, Katusic Z. (2014). Endothelial nitric oxide deficiency promotes Alzheimer's disease pathology. *Author Manuscript*. 127(5): 691–700.

Kidd P. (2005). Neurodegeneration from Mitochondrial Insufficiency: Nutrients, Stem Cells, Growth Factors, and Prospects for Brain Rebuilding Using Integrative Management. *Alternative Medicine Review*. 10:1-26.