



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“EFECTO NEUROPROTECTOR DEL NOPAL CONTRA SIGNOS DE
NEURODEGENERACIÓN Y DETERIORO COGNOSCITIVO EN UN MODELO
ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICO”**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. LUIS ADOLFO LEONHARDT AVALOS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directora de la Tesis:

Dra. Claudia Pérez Cruz

México, D.F.

Enero 2015

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del departamento de Farmacología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo #356065 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Claudia Pérez Cruz por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo en su laboratorio.

A mis sinodales:

Dr. Benjamín Florán Garduño

Dr. Francisco García Sierra

Por su tiempo y comentarios para enriquecer este trabajo.

A la Dra. Nimbe Torres, Azalia y Mónica por su disposición para la realización de este trabajo.

A la Dra. Jaqueline I. Acosta García y a Eduardo García Osornio, auxiliar de investigación y técnico respectivamente del laboratorio de neuroplasticidad y neurodegeneración, por su tiempo y su enorme apoyo para realizar los experimentos y estandarizar la técnica del marcaje diolístico y las pruebas conductuales.

En especial, quiero agradecer al Dr. Jaime y al Dr. Francisco por compartir sus conocimientos y enseñarme el protocolo de Inmunohistoquímica.

También quiero agradecer a mis amigos del CINVESTAV por su amistad y apoyo. En particular a Silvia y a Daniel, amigos del laboratorio, por soportarme todo este tiempo.

Por último, quiero agradecer a mi novia Ixchel por sus regaños y motivación para seguir adelante. Por su ayuda para levantarme en momentos difíciles y por entregarme su amor incondicional. Te amo.

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Síndrome metabólico (SM).....	7
a) Generalidades	7
b) Diagnóstico	8
c) Estadísticas en México y el mundo.....	9
d) Impacto del SM y la obesidad sobre la salud.....	10
2. Incidencias de demencias, deterioro cognitivo y enfermedad de Alzheimer (EA) en sujetos con SM y obesidad	10
a) SM como factor de riesgo para desarrollar demencia y EA.....	10
b) SM y agregación del péptido A β	12
c) SM y formación de marañas neurofibrilares.....	13
d) SM y otros marcadores de neurodegeneración	15
- El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	15
- Gliosis y alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE).....	15
- Productos de glucosilación avanzada (AGE's).....	16
- Alteraciones en la morfología neuronal.....	16
3. Edad como factor determinante para el desarrollo de SM y demencia	17
a) Tratamiento o prevención.....	18
4. Alimentos Funcionales (AF)	19
a) Generalidades	19
b) AF en SM y obesidad	19
c) AF en demencias y EA.....	20
JUSTIFICACIÓN	21
HIPOTESIS	22
OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares.....	23

METODOLOGÍA.....	24
Inducción del SM.....	24
Pruebas conductuales.....	24
Alternación espontánea en el laberinto en T.....	24
Reconocimiento de objeto novedoso	25
Obtención de tejido	26
Morfología de espinas dendríticas:	26
Determinación de la proteína fibrilar acídica de la glia (GFAP):.....	27
Análisis estadístico:.....	28
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES.....	40
PERSPECTIVAS	41
Bibliografía	42

Resumen

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por al menos tres de los siguientes factores: obesidad, niveles altos de triglicéridos (TG) y de glucosa y niveles bajos de lipoproteína de alta densidad. Recientemente, se ha demostrado que pacientes con SM presentan un mayor riesgo a desarrollar deterioro cognitivo leve e incluso la enfermedad de Alzheimer (EA). El uso de compuestos anti-inflamatorios y anti-oxidantes parece disminuir los signos de neurodegeneración en modelos animales de la EA. Recientemente, se ha demostrado que en pacientes con SM tratados con un portafolio dietario (PD) basado en nopal, semilla de chía y soya durante dos meses, se obtuvo una mejora metabólica significativa reduciendo los niveles de TG, insulina, colesterol, así como del peso corporal. En este estudio se evaluó el efecto neuroprotector del nopal en un modelo animal de SM. Un grupo de Ratas Wistar macho fue alimentado con 20% de grasa y 5% de azúcar en el agua durante 6.5 meses. Una vez alcanzado el criterio para SM, las ratas fueron sometidas a una dieta adicionada con nopal al 5 % durante un mes. Se utilizó el laberinto en T y la prueba de reconocimiento de objeto novedoso para evaluar la integridad cognitiva. Mediante el marcaje Diolístico y el Software Definiens *XD* se analizó la morfología de espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo. También se determinaron los niveles de GFAP en hipocampo mediante inmunohistoquímica (IHC). Nuestros resultados muestran que las ratas obesas presentaron alteraciones en la morfología neuronal e inflamación. Estas alteraciones se normalizaron en el grupo tratado con 5 % nopal. Por lo tanto, el uso de alimentos funcionales como el nopal podría ser una estrategia terapéutica para prevenir o retrasar el deterioro cognitivo en pacientes obesos o con SM.

Abstract

Metabolic syndrome (MS) is characterized by at least three of the following factors: obesity, high triglycerides levels, increased glucose, hypertension and low HDL (high density lipoproteins) levels. These factors increase the probability to develop cardiovascular disease and other health problems. Recently, it has been demonstrated that MS patients have a higher risk to develop both mild cognitive impairment (MCI) and dementias, including Alzheimer's disease (AD), when compared with healthy subjects. The use of anti-inflammatories and antioxidants seems to diminish neurodegeneration in animal models of AD. Recently, our group has shown that MS patients treated with a functional food regime based on nopal, chia and soy during two months showed a reduction of triglycerides, insulin and cholesterol levels, protein c-reactive as well as body weight near to normal. Functional food enriched in anti-inflammatory and anti-oxidants substances can be a reliable strategy to fight against dementia induced by MS. In this study we tested the neuroprotective effect of nopal in an animal model of MS. Male Wistar rats were fed with 20% fat and 5% sugar during 6.5 months until they reach a criterion for MS. Thereafter, they were fed with a dietary pattern (DP) during one month. Cognitive impairment was evaluated by the use of T-maze and New Object Recognition test. We analyzed the integrity of dendritic spines by using Diolistic Labelling and GFAP immunohistochemistry in the hippocampus. Our results demonstrated that rats with MS showed alteration in neuronal morphology and increased inflammation. These alterations were reduced after a treatment with 5% of nopal. These neuroprotective effects could be the result of metabolic stabilization of MS that may reduce the development of dementia in MS patients.

INTRODUCCIÓN

1. Síndrome metabólico (SM)

a) Generalidades

La primera descripción del SM la realizó el endocrinólogo Gerald Reaven en 1988. Reaven denominó síndrome X a la presencia de tres factores: hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión, y su relación con enfermedades cardiovasculares y resistencia a la insulina (Reaven, 1988). También fue conocido como “el cuarteto de la muerte” (Kaplan, 1989) y, más recientemente, como “síndrome de resistencia a la insulina” (Alexander y cols., 2003; Haffner y Cassells, 2003). Pero no fue sino hasta 1998 que la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una definición del SM, la cual aún sigue vigente. (Tabla1).

El SM se caracteriza por la presencia de hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertensión, hipertrigliceridemia, disminución de las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumento de lipoproteínas de baja densidad, aumento en las concentraciones de ácidos grasos libres y obesidad (Alberti y Zimmet, 1998)

Actualmente, no existe una definición que sea aceptada de manera universal. A lo largo de los años varios organismos han propuesto nuevos criterios para el diagnóstico del SM, entre los cuales destacan la OMS, el Programa Nacional de Educación en Colesterol (NCEP-ATP III) y la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) (Alberti y Zimmet, 1998; ATP-III, 2001; IDF, 2006). En la tabla 1 se resumen las diferentes definiciones del SM.

Las alteraciones metabólicas asociadas al síndrome metabólico se deben principalmente a la obesidad, la cual se define como una acumulación anormal o excesiva de grasas, la cual incrementa las probabilidades de padecer otros problemas de salud como diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer. El desarrollo de la obesidad se produce

principalmente debido a una mala alimentación (ingesta excesiva de grasas saturadas y bebidas con un alto contenido de azúcares) y a la falta de actividad física (OMS, 2014).

Tabla 1. Definiciones del SM		
OMS	IDF	NCEP-ATP III
<p>La presencia de diabetes tipo 2 (DT2), intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina y dos o más de los siguientes criterios:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Hipertensión arterial (140/90 mmHg) 2. Hipertrigliceridemia (>150 mg/dL) y/o colesterol HDL < 35 mg/dL en hombres o < 40 mg/dL en mujeres. 3. Microalbuminuria (> 20 microgramos/min) 4. Obesidad: IMC > 29.9 kg/m² 	<p>La presencia de obesidad central (definida como una circunferencia de cintura > 90 cm para hombres y > 80 cm para mujeres) junto con dos o más de los siguientes factores:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Hipertrigliceridemia: 150 mg/dL. 2. HDL bajo: < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres. 3. Hipertensión: 130/85 mmHg. 4. Glucemia elevada en ayuno (100 mg/dL) o diagnóstico previo de DT2 	<p>La presencia de tres o más de las siguientes condiciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Obesidad: Cintura > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres. 2. Hipertrigliceridemia: 150 mg/dL 3. HDL bajo: < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg en mujeres. 4. Hipertensión: 130/85 mmHg. 5. Glucemia elevada en ayuno (100 mg/dL) o diagnóstico previo de diabetes.

b) Diagnóstico

Una manera simple de determinar si una persona padece obesidad es mediante el índice de masa corporal (IMC), el cual se obtiene al dividir el peso de una persona (kg) entre el cuadrado de su altura (m). Se considera que una persona tiene sobrepeso si tiene un IMC ≥ 25 y si el IMC ≥ 30 es considerada obesa (OMS, 2014). También se considera que una persona es obesa si tiene un perímetro de cintura ≥ 90 cm para hombres y ≥ 80 cm en mujeres (IDF, 2006).

Se considera que una persona tiene SM si cumple con alguna de las definiciones mencionadas en la tabla 1.

c) Estadísticas en México y el mundo

Un cuarto de la población mundial tiene SM (IDF, 2006). Dicha cifra parece ir en aumento, de manera paralela, junto con la prevalencia de la obesidad, el factor más importante para el desarrollo del SM (Hossian y cols., 2007). Según datos de la OMS (2008) el 35 % de los adultos mayores de 20 años tienen sobrepeso y 11% padecen obesidad. Sin embargo, muchas veces la prevalencia de una misma región varía dependiendo del criterio que se utilice,

Desde 1988 a 1994, un cuarto de la población de Estados Unidos padecían SM según el criterio de la NCEP-ATP III, afectando a hombres y mujeres por igual (22.8% y 22.6% respectivamente) (Ford, 2002). Por otra parte, en países del continente Asiático, como India, la prevalencia de SM es de 25.8%, 18.3% y 23% según los criterios de la IDF, NCEP-ATP III y OMS respectivamente.

En países Europeos como en Francia, la prevalencia de SM es de 10% para hombres y 7% para mujeres según el criterio de la NCEP-ATP III; sin embargo, al utilizar los criterios de la OMS, la prevalencia fue de 23% y 12% respectivamente (Kahn y cols., 2005).

Según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2006), la prevalencia de SM en México es de 36.8% y 49.8% en adultos mayores a 20 años según los criterios de la NCEP-ATP III y la IDF respectivamente. (Rojas y cols., 2009). Por su parte, en 2008, González-Chávez y cols. determinaron la prevalencia de SM en una población de pacientes no diabéticos de acuerdo a los criterios de la OMS, IDF y NCEP-ATP III y encontraron que las prevalencias del SM con los 3 criterios fueron de 36.5%, 43.3% y 46.5%, respectivamente.

d) Impacto del SM y la obesidad sobre la salud

Muchas de las personas que padecen SM presentan resistencia a la insulina e hipertensión, lo cual aumenta sus probabilidades de desarrollar diabetes, sufrir un ataque al corazón o un derrame cerebral. La diabetes afecta cerca del 5% de la población a nivel mundial y mueren 3.2 millones de personas debido a complicaciones asociadas a esta enfermedad. La diabetes tipo 2 es la forma más común de diabetes (90%) y se ha vuelto la principal causa de muerte prematura debido a que aumenta el riesgo de desarrollar alguna enfermedad cardiovascular. Otras complicaciones relacionadas con la diabetes son: ceguera (retinopatía diabética), insuficiencia renal y amputación de miembros debido a la reducción del flujo sanguíneo y presencia de ulceraciones (UKPDS, 1996; IDF, 2006; OMS, 2012).

De manera similar, en personas obesas se observa un incremento en la presión arterial, triglicéridos, colesterol, hiperglicemia y resistencia a la insulina. Dichos factores aumentan la probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2 y sufrir un infarto o un derrame cerebrovascular (Carey y cols., 1997; Carr y cols., 2004).

2. Incidencias de demencias, deterioro cognitivo y enfermedad de Alzheimer (EA) en sujetos con SM y obesidad

a) SM como factor de riesgo para desarrollar demencia y EA

La demencia es un síndrome de naturaleza crónica, en el cual hay una alteración de múltiples funciones cerebrales como: memoria, pensamiento, orientación, comprensión, lenguaje, aprendizaje y toma de decisiones. A nivel mundial hay 35.6 millones de personas que padecen algún tipo de demencia. La EA es la forma de demencia más común y representa entre un 60% y 70% de los casos (OMS, 2012).

La EA es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria, placas amiloideas (depósitos extracelulares del péptido A β) y marañas neurofibrilares (depósitos intracelulares de la

proteína tau hiperfosforilada) (Braak y Braak, 1991; Selkoe, 2001). Existen 2 formas de la EA: 1) tipo familiar, el cual se asocia a mutaciones en el gen de la proteína precursora del beta amiloide (APP) o en aquellos que codifican para las enzimas (presenilinas) que se encargan de procesar a la APP (Goate y cols., 1991; Levy-Lahad y cols., 1995 Sherrington y cols., 1995; Bu, 2009); 2) tipo esporádico, el cual se ha asociado a diferentes factores de riesgo como: la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (ApoE4), diabetes, obesidad, síndrome metabólico, hipertensión, dislipidemias y la edad (Corder y cols., 1993; Poirier y cols., 1993; Kalmijin y cols., 1995; Elias y cols., 2005; Farooqui y cols., 2012).

En la EA se ha observado la presencia de placas amiloideas y marañas neurofibrilares en regiones cerebrales involucradas en procesos de memoria y aprendizaje, entre ellas el hipocampo, además de otras alteraciones como: muerte neuronal, neuroinflamación y pérdida de espinas dendríticas (Braak y Braak, 1991; Selkoe, 2001; Akiyama y cols., 2000; Scheff y cols., 2007).

La formación hipocampal (subiculum, hipocampo y corteza entorrinal) es una región cerebral que se encarga de modular ciertos procesos cognitivos. Esta región es una de las zonas que se ven afectadas principalmente en enfermedades crónico-degenerativas (EA, SM, obesidad, diabetes, etc) (Zhao y cols., 1999; Price y cols., 2001).

Varios estudios clínicos respaldan la relación que existe entre el síndrome metabólico y el deterioro cognoscitivo. En uno de estos estudios realizado por Yaffe y cols., en 2004, se reportó que los adultos mayores (74 años) con SM presentaban mayores signos de demencia en comparación con personas sanas de la misma edad (Yaffe y cols, 2004). Más tarde, en 2011, Baker y cols., reportaron que adultos mayores (74 años) con DT2, otro componente del SM, presentaban una reducción en la tasa del metabolismo de glucosa en cerebro, la cual se correlacionaba de manera directa con los signos de demencia.

En 1996, Ott y cols., reportaron que las personas con diabetes mayores a 55 años tienen el doble de riesgo de desarrollar la EA en comparación con personas sanas. Más tarde, en 2006, Vanhanen y cols., reportaron que la EA se presentaba con mayor frecuencia en personas con SM en comparación con personas sin SM (7.2% vs 2.8%). También observaron que la prevalencia de la EA fue mayor en mujeres con SM respecto a las mujeres pertenecientes al grupo control (8.3% vs 1.9%); sin embargo, no observaron diferencias entre los hombres con y sin SM (3.8% vs 3.9%).

Por otra parte, existen reportes clínicos en donde se ha observado que personas con diabetes y la EA tienen una mayor cantidad de placas amiloideas y marañas neurofibrilares en comparación con sujetos con la EA y sin diabetes (Peila y cols., 2002; Janson y cols., 2004).

b) SM y agregación del péptido A β

A la fecha, no se conocen exactamente los mecanismos que relacionan al SM con la EA; sin embargo, varios estudios sugieren que la presencia de SM, o alguno de los factores que lo componen, favorecen la formación de placas amiloideas al alterar el equilibrio de producción y/o degradación del péptido A β (figura 1).

Uno de estos factores en común entre la EA y el SM, es la resistencia a la insulina. La insulina es una hormona que se produce en las células β del páncreas, que al unirse a sus receptores en la periferia, regula la captura de glucosa desde la sangre hacia el interior de las células. Sin embargo, a nivel del sistema nervioso central (SNC), la insulina participa en otros procesos fisiológicos como: crecimiento axonal, supervivencia neuronal y plasticidad sináptica, (Mill y cols., 1985; Wang y cols., 1992).

Una vez que la insulina ha ejercido su acción mediante la activación de sus receptores, es degradada por la enzima degradadora de insulina (IDE por sus siglas en inglés), la cual también participa en la degradación del A β . Se ha reportado que en condiciones de hiperinsulinemia, concentraciones elevadas

de insulina, favorecen la acumulación del A β al competir ambos sustratos por la misma enzima (Miller y cols., 2003; Cook y cols., 2003; Shiiki y cols., 2004). Además, se ha reportado que la supresión del gen que codifica para la IDE produce un incremento en las concentraciones cerebrales de A β (Farris y cols., 2004).

Por otra parte, se ha reportado que el colesterol desempeña un papel importante en la producción del péptido A β . Se ha reportado que el procesamiento de la APP mediante la vía amiloidogénica (corte de la APP por la β y γ secretasas) tiene lugar en las llamadas “balsas de membrana” (rafts), regiones ricas en colesterol, esfingolípidos y caveolina. Al incrementar la concentración de colesterol, también aumenta el tamaño y número de balsas de membrana, la expresión de la APP y la actividad de las β y γ secretasas, favoreciendo de esta manera la acumulación del péptido A β y, por lo tanto, la formación de placas amiloideas (Bodovitz y Klein, 1996; Wahrle y cols., 2002; Cordy y cols., 2003, 2006; Thirumangalakudi y cols., 2008; Puig y cols., 2012).

c) SM y formación de marañas neurofibrilares

La resistencia a la insulina también es un factor importante en la formación de marañas neurofibrilares, ya que promueve la hiperfosforilación y agregación de la proteína tau (figura 1).

La hiperfosforilación de la proteína tau es un evento temprano en la patogénesis de la EA y ocurre antes de la formación de las marañas neurofibrilares (Gendron y Petrucelli, 2009). La proteína tau es fosforilada por varias cinasas, entre ellas la glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β). La GSK-3 β es una enzima constitutivamente activa que se encuentra río abajo de la cascada de señalización del receptor a insulina. Al unirse la insulina con su receptor, se inhibe a la enzima GSK-3 β (Siddle y cols., 2001). Por lo tanto, una alteración en la señalización de este receptor puede aumentar el grado de fosforilación de la proteína tau. Existen varios reportes en donde se ha demostrado que en condiciones de hiperinsulinemia se produce un incremento

en los niveles de fosforilación de la proteína tau mediada por parte de la GSK-3 β . Por ejemplo, Calvo-Ochoa y cols. (2014) demostraron que en ratones obesos con hiperinsulinemia presentaban alteraciones en la señalización del receptor a insulina, así como un incremento en la fosforilación de la proteína tau en la serina 199/202, un sitio de fosforilación de la GSK-3 β (Bhat y Thirumangalakudi, 2013).

Por otra parte, existe evidencia que durante la EA y el SM se alteran algunas fosfatasa, como la proteína-fosfatasa 2A (PP2A), la cual es una de las principales enzimas responsables de la desfosforilación de la proteína tau (Planel y cols., 2007; Qian y cols., 2010; Torrent y Ferrer, 2012).

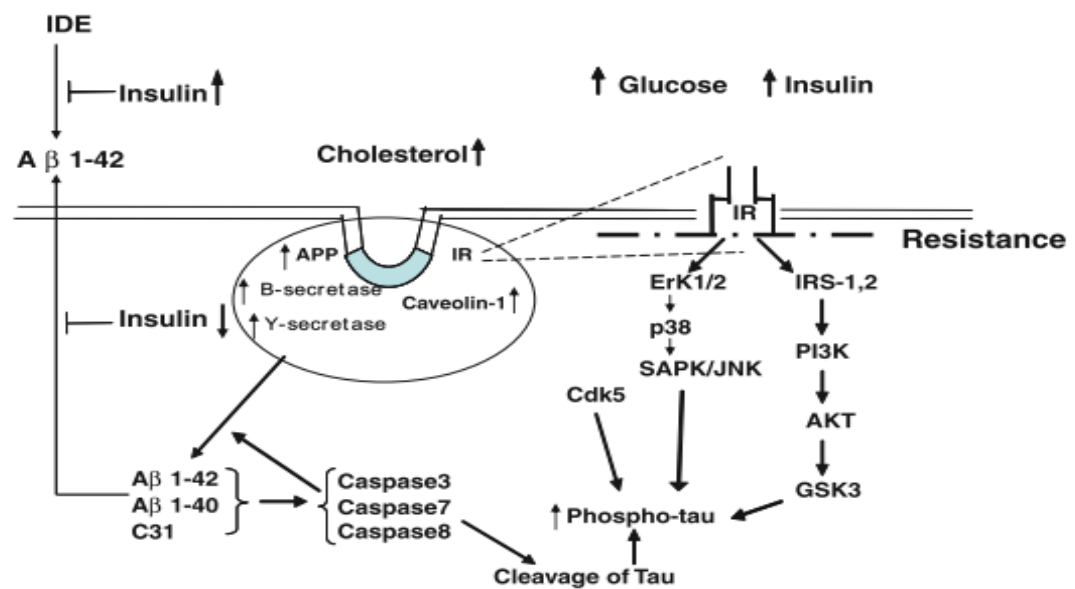


Figura 1. Efecto del colesterol y resistencia a la insulina sobre la formación de placas amiloideas y marañas neurofibrilares. Alteraciones en la señalización del receptor a insulina aunado a concentraciones elevadas de colesterol favorecen la agregación del péptido A β , así como la hiperfosforilación de la proteína tau (tomado de Sima, 2010).

d) SM y otros marcadores de neurodegeneración

- El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

El BDNF participa en procesos de supervivencia neuronal, plasticidad sináptica, memoria, aprendizaje y en la regulación de la ingesta de alimentos (Barde y cols., 1982; Rothman y cols., 2012).

Existe evidencia de que bajas concentraciones de BDNF pueden producir un incremento en la ingesta de alimentos y, por lo tanto, el desarrollo de obesidad. También se ha reportado que en personas que padecen la EA tienen bajos niveles de BDNF (Phillips y cols., 1991). Experimentos realizados en modelos animales de obesidad mostraron que existe una disminución en los niveles de BDNF en el hipocampo, lo cual se correlaciona con un deterioro cognoscitivo y menor neurogénesis (Stranaham y cols., 2008; Pistell y cols., 2009).

- Gliosis y alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE es un sistema de células endoteliales, entrelazadas mediante uniones estrechas, que limita el paso de sustancias desde la circulación sanguínea hacia el cerebro y viceversa (De Vries y cols., 1997; Ballabh y cols., 2004).

Se ha demostrado que en personas con la EA hay un aumento en la permeabilidad de la BHE (medida mediante un incremento en la concentración de albumina en líquido cefalorraquídeo) y se sugiere que dicha alteración precede el desarrollo de demencia (Skoog y cols., 1998; Bowman y cols., 2007).

Por otra parte, se ha demostrado que el consumo excesivo de grasas produce una disminución en los niveles de ocludinas (proteínas que participan en la formación de uniones estrechas), así como un incremento en la activación de glía y en la expresión de genes involucrados con procesos

neuroinflamatorios (Granholm y cols., 2008; Pistell y cols., 2009; Freeman y Granholm, 2012).

Por otra parte, se ha reportado que en el tejido adiposo de pacientes obesos hay aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (Hotamisligil y cols., 1993; Fried y cols., 1998; Kern y cols., 2001). La neuroinflamación se ha asociado con cambios morfológicos y neurodegeneración (Cagnin y cols., 2001; Rao y cols., 2012).

- Productos de glucosilación avanzada (AGE's)

La interacción de los AGE's con su receptor (RAGE) produce un incremento en la actividad del factor de transcripción $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), el cual participa en la expresión de genes involucrados en procesos inflamatorios, cuyos productos podrían desencadenar procesos neurodegenerativos y, de esta manera, contribuir a la aparición de signos de demencia (Yan y cols., 1994).

La cantidad de AGE's se incrementa conforme avanza la edad; sin embargo, se ha reportado que las concentraciones cerebrales de estos productos es mayor en personas con la EA y diabetes (Girones y cols., 2004).

- Alteraciones en la morfología neuronal

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que se encuentran a lo largo de las dendritas de las neuronas en donde ocurre la sinapsis (comunicación celular). Los cambios en el número y tamaño de estas estructuras están relacionados con la formación, mantenimiento y eliminación de sinapsis (Ramon y Cajal, 1888; Yuste y Bonhoeffer, 2002).

Al analizar el cerebro de pacientes con la EA y de modelos animales que representan esta patología, se encontró una disminución en el número de contactos sinápticos, la cual se correlaciona de manera positiva con problemas

de memoria y aprendizaje (DeKosky y Scheff, 1990; Aoki y cols., 2007; Arendt, 2009; Perez-Cruz y cols., 2011)

De manera similar, se ha demostrado que la presencia de SM y obesidad, en modelos animales, produce alteraciones sinápticas y deterioro cognoscitivo (Stranahan y cols., 2008; Calvo-Ochoa y cols., 2014; Arnold y cols., 2014).

3. Edad como factor determinante para el desarrollo de SM y demencia

El desarrollo del cerebro humano comienza a partir de la tercera etapa gestacional y se mantiene hasta el final de la adolescencia (Stiles y Jernigan, 2010). Durante el periodo postnatal y la niñez, el nivel de conectividad en el cerebro es mucho mayor que el de los adultos (Innocenti y Price, 2005).

Debido a que el cerebro aun se encuentra en un proceso de maduración durante la niñez y la adolescencia, el desarrollo de obesidad o SM durante edades más tempranas puede ser un factor determinante en el desarrollo de algún tipo de demencia.

Estudios en animales han demostrado que la ingesta excesiva de grasas produce obesidad en ratones jóvenes (3 semanas) y adultos (12 semanas). Sin embargo, al evaluar la memoria de los animales, únicamente los ratones jóvenes mostraron signos de deterioro cognoscitivo además de una disminución en los niveles de neurogénesis en hipocampo (Boitard y cols., 2012).

Por otra parte, existe evidencia de que el desarrollo de diabetes y/u obesidad en adultos jóvenes aumenta casi tres veces el riesgo de padecer algún tipo de demencia durante la vejez (Beeri y cols., 2004; Kivipelto y cols., 2005) en comparación con sujetos que desarrollaron diabetes y/u obesidad en edades avanzadas. Además, se ha reportado que si una persona tiene obesidad junto con concentraciones elevadas de colesterol e hipertensión, el

riesgo de padecer demencia durante la vejez aumenta en un 60% (Kivipelto y cols., 2005).

a) Tratamiento o prevención

Los medicamentos utilizados en el tratamiento del SM y la obesidad están dirigidos a restaurar las alteraciones metabólicas observadas en dichas patologías (hiperglucemia, colesterol elevado, etc.). Por ejemplo, para el tratamiento de la DBT1 se administra insulina para regular los niveles elevados de glucosa en sangre. Por otro lado, para el tratamiento de la DBT2 se prescriben fármacos que promueven la liberación de insulina en el páncreas. Sin embargo, se ha reportado que horas después de la administración de insulina aumenta la concentración plasmática del péptido A β y hay una mayor incidencia de la EA en pacientes diabéticos que utilizan insulina, o alguno de los medicamentos que promueven su liberación, en comparación con personas diabéticas y sin tratamiento (Ott y cols., 1999; Kupczewksa-Karczewska y cols., 2012).

También existen medicamentos para regular la absorción (orlistat), síntesis (estatinas) y oxidación de lípidos (fibratos). Sin embargo, estos medicamentos pueden llegar a dañar órganos como el hígado, músculo, riñón y corazón (Pierce y cols., 1990; Shepherd y cols., 1995).

Por otra parte, el tratamiento mediante restricción en la ingesta de calorías, así como el ejercicio pueden ayudar a bajar de peso y restaurar las alteraciones metabólicas asociadas por la obesidad. Además, existen reportes de que el ejercicio y la restricción de alimentos incrementan los niveles de BDNF en cerebro (Matson, 2012; Stranahan y cols., 2009). Se propone que el tratamiento más efectivo para combatir estas complejas enfermedades crónico-degenerativas es la prevención. Una alternativa es mediante la ingesta de nutrimentos o dietas altas con potencial protector, ya sea por el contenido de compuestos antioxidantes o con capacidad anti-inflamatoria.

4. Alimentos Funcionales (AF)

a) Generalidades

Todos los alimentos son funcionales a cierto nivel fisiológico, ya que aportan nutrientes necesarios para mantener en estado óptimo todos los procesos de nutrición y desarrollo del organismo. (ADA, 2004)

Actualmente no existe una definición universal de los alimentos funcionales. Sin embargo, se han propuesto varias definiciones por parte de algunas organizaciones integradas por especialistas en el tema. Por ejemplo, La Asociación Dietética Americana (ADA), la organización más grande de profesionales en nutrición dentro de los Estados Unidos, define a los alimentos funcionales como: “alimentos que, además de su contenido nutricional, contienen sustancias que tienen un efecto benéfico sobre la salud y reducen el riesgo de padecer enfermedades crónicas” (ADA, 2004). Cabe mencionar que la definición de alimentos funcionales propuesta por la ADA incluye a los alimentos enriquecidos o fortificados, suplementos alimenticios y alimentos enteros.

b) AF en SM y obesidad

Actualmente se le ha dado una gran importancia en el uso de alimentos funcionales para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas, ya que no se presentan tantos efectos adversos como aquellos observados con tratamientos farmacológicos.

Varios estudios clínicos y en modelos animales han demostrado que el uso de alimentos funcionales, como nopal, soya y chia, como tratamiento para la obesidad y el SM puede reestablecer todas las alteraciones bioquímicas asociadas a dichas enfermedades (hiperglucemia, dislipidemias, estrés oxidativo, etc.) (Moran-Ramos y cols., 2012) (Guevara-Cruz y cols., 2012).

En México, el uso del nopal es un remedio popular para el tratamiento de la diabetes, una de las complicaciones del SM. Estudios clínicos han

demostrado que el consumo de nopal en pacientes mexicanos con DBT2 disminuye los picos posprandiales de glucosa e insulina. Estos efectos se deben a que el nopal reduce los niveles del péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP), una hormona producida en las células intestinales (incretina) que promueve la liberación de insulina en el páncreas y se encuentra en altas concentraciones en pacientes con DBT2 en estado postprandial (Lopez-Romero y cols., 2014). Además, existen reportes en donde se ha demostrado que el consumo de fibra soluble del nopal (pectinas) reduce la concentración de lípidos en plasma (Fernandez y cols., 1994). Un posible mecanismo mediante el cual el nopal podría reducir las concentraciones plasmáticas de lípidos sería limitando su absorción en el tracto gastrointestinal (Ulrich, 1987).

Por otra parte, se ha reportado que el nopal posee una gran cantidad de sustancias antioxidantes y antiinflamatorias como: kaempferol (2 g/kg), isoramnentina (4 g/kg), quercetina (2 g/kg), β -caroteno (1.1 g/kg) y vitamina C (2 g/kg), las cuales pueden reducir los niveles de estrés oxidativo asociados a la obesidad y el SM (Medina-Torres y cols., 2011).

c) AF en demencias y EA

Varios estudios con modelos animales de la EA han demostrado que el uso de alimentos funcionales enteros como la curcumina y suplementos alimenticios reducen de manera significativa los niveles de $A\beta$, fosforilación de tau, neuroinflamación, la resistencia a la insulina en SNC y mejoran la memoria (Ma y cols., 2009).

Además, estudios clínicos han demostrado que el uso de alimentos enriquecidos con folato, Ginko Biloba y suplementos alimenticios mejoran de manera significativa las habilidades cognitivas de personas con la EA (Kanowski y Hoerr, 2003; Le Bars, 2003; Iyer y Tomar, 2009; Scheltens y cols., 2012). Por lo tanto, el uso de alimentos funcionales podría ser una terapia interesante para evitar el desarrollo de algún tipo de demencia.

JUSTIFICACIÓN

Para este proyecto, se propone el uso de modelos animales de síndrome metabólico (SM) para caracterizar los efectos neuroprotectores del nopal, un alimento funcional, a nivel sináptico, celular y conductual. Se espera que el nopal evite la neurodegeneración y esto se vea reflejado en exámenes de conducta, además de preservación de entidades sinápticas, marcadores de neurodegeneración e inflamación. Por lo tanto, este proyecto propone que al restablecer los parámetros bioquímicos y metabólicos inducidos por SM se evitará la neurodegeneración y el deterioro cognoscitivo.

HIPOTESIS

El uso de nopal, un alimento funcional, tendrá un efecto neuroprotector en un modelo animal de síndrome metabólico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector del nopal sobre la pérdida sináptica, inflamación y alteración de la conducta en animales con síndrome metabólico.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto neuroprotector del nopal en ratas con SM mediante su desempeño en la prueba de alternación espontánea en el laberinto en T y de reconocimiento de objeto novedoso.
- Determinar la presencia de astrocitos activos (marcaje para GFAP) en el cerebro de estos animales como marcador de inflamación.
- Analizar comparativamente la morfología de las espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo en animales tratados y no tratados con dieta de nopal.

METODOLOGÍA

Inducción del SM

Se utilizaron ratas Wistar (250 g), divididas en 5 grupos: Grupo 1 (n=6), animales alimentados con dieta AIN-93, la cual contiene 20 % de caseína como fuente de proteína, durante 7.5 meses (Control); Grupo 2 (n=3), animales alimentados con una dieta alta en grasa saturada (20%) y una solución de sacarosa al 5% en agua durante 7.5 meses (DAGS+S); Grupo 3 (n=4), animales alimentados con una DAGS+S durante 6.5 meses y un mes subsiguiente con una dieta control (AIN-93); Grupo 4 (n=5), animales alimentados con una DAGS+S durante 6.5 meses y un mes subsiguiente con una dieta control y 5% de nopal (AIN-93+N); Grupo 5 (n=5), animales alimentados con una DAGS+S durante 6.5 meses y un mes subsiguiente con una DAGS+S y 5% de nopal (DAGS+S+N). Al término del tratamiento se realizaron las pruebas conductuales y se extrajo el cerebro para su análisis.

Pruebas conductuales

Alternación espontánea en el laberinto en T

Para esta prueba se utilizó un laberinto de acrílico que consta de 3 brazos, dos brazos objetivo (50 x 20 x 30 cm) y uno de inicio (60 x 20 x 30 cm), y una división central (30 x 30 cm). Esta prueba consta de dos fases, una de muestra y otra de prueba. En la fase de muestra, con la división central en su lugar y todas las puertas abiertas, se coloca al animal en el brazo de inicio y se permite que haga una elección. Una vez realizada la elección, se coloca la puerta del brazo elegido y se confina al animal en dicho brazo por un tiempo de 30 s. Una vez transcurrido este tiempo, se coloca la puerta del brazo opuesto y se retiran la división central y la puerta del brazo elegido para que el animal ingrese al brazo de inicio de donde es retirado por un minuto (intervalo de retención). En la fase de prueba, se coloca nuevamente al animal en el brazo de inicio, sin la división central y todas las puertas abiertas, y se permite que realice una elección. Dos horas después se repite la prueba. En ambas

fases de la prueba se registran el brazo elegido y la latencia. Si un animal no dejaba el brazo de inicio en 90 segundos se retiraba y se probaba más tarde. Se realizó un total de 5 pruebas por animal.

Reconocimiento de objeto novedoso

Se coloca al animal en una tina (80 x 46 x 30 cm) y se permite que explore durante 5 minutos. 24 horas después, se vuelve a colocar al animal en la tina y se le presentan dos objetos idénticos (latas de jugo), permitiendo que explore durante 5 minutos. Los objetos se colocan en el centro de la caja a una distancia de 25 cm entre ellos. Una vez transcurridos los 5 min, se retira al animal de la tina por un período de 30 min (período de retención). Después que finalice el tiempo de retención se coloca nuevamente al animal en la tina junto con dos objetos, uno familiar (lata de jugo) y uno nuevo (taza) colocados en la misma posición. Se considera conducta exploratoria: tocar el objeto con las patas, olfatearlo, morderlo o montarlo. Se registra el tiempo de exploración de cada objeto en ambas sesiones de la prueba. Se deben descartar a los animales que no acumulen 15 segundos de exploración en la segunda fase de la prueba. Este tiempo es el mínimo requerido para considerar que el animal exploró lo suficiente y de esta manera evitar resultados erróneos por falta de exploración. Una vez determinado el tiempo de exploración se calcula el índice de reconocimiento sustituyendo los valores obtenidos en la segunda sesión en la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de reconocimiento (IR)} = \frac{\text{Objeto nuevo (s)}}{\text{Objeto familiar (s)} + \text{Objeto nuevo (s)}}$$

Se considera que un animal reconoció la presencia de un objeto nuevo cuando obtiene un IR > 0.5.

Obtención de tejido

Al término de los 7.5 meses, los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se extrajo el cerebro. Una vez hecho esto, el cerebro se dividió en 2 hemisferios. El primero se colocó en una solución de fijación, paraformaldehído (PFA) al 4%, a 4 °C durante 5 horas. Posteriormente, con ayuda de un vibratomo, se cortó el hemisferio en rebanadas coronales de 150 µm para analizar la morfología de espinas dendríticas. El segundo hemisferio se colocó en una solución de PFA al 4 % a 4 °C durante 5 horas. Posteriormente, con ayuda de un micrótomo se cortó en secciones coronales de 30 µm para las pruebas de Inmunohistoquímica (IHC).

Morfología de espinas dendríticas:

Para esta prueba, se utilizaron 3 rebanadas coronales de cerebro de 150 µm por cada animal, a las cuales se les disparó partículas de tungsteno recubiertas con un tinte fluorescente (DIL) con ayuda de la Helios Gene Gun, y se dejaron en una solución de PBS 1X a 4 °C por 24 horas. Posteriormente, las rebanadas se colocaron en portaobjetos, utilizando glicerol como medio de montaje. Una vez montadas las rebanadas, se tomaron 6 imágenes por animal de dendritas basales aisladas de las neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo en el microscopio confocal (Leica SP8) con un objetivo de 100 x (zoom factor = 5), a una velocidad de 600 Hz, Frame Average = 1, Line Average = 1, Frame Accumulation = 1, Line Accumulation = 1, z stack = 0.1 µm. Cabe mencionar que el valor de ganancia utilizado se ajustó para cada imagen para evita el exceso de fluorescencia. Posteriormente, se realizó un “crop” de la imagen (20 x 10 µm). Finalmente, se realizó una compresión de las imágenes de la secuencia adquirida y a partir de ésta se calculó la densidad de espinas dendríticas mediante un conteo manual utilizando el software Image J.

Determinación de la proteína fibrilar acídica de la glia (GFAP):

Se utilizaron rebanadas coronales de 30 μm (3 por animal), las cuales recibieron un tratamiento con un buffer de citratos a 100 °C para desenmascarar epítopes. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 10 minutos y se permeabilizó el tejido con una solución de PBS-Tritón al 0.2% (PBSt-0.2%) durante 20 minutos. Al término de este tiempo, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de H_2O_2 al 0.3% en PBS durante 10 minutos. Una vez hecho esto, se realizaron 3 lavados con PBSt-0.2% y se procedió a incubar con una solución de bloqueo (Albúmina de Suero de Bovino, BSA por sus siglas en inglés) al 3% en PBS durante 30 minutos. Después de bloquear, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBSt-0.2% y se incubó con el anticuerpo primario (anti-GFAP, 1:500) durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Después de la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBSt-0.2% y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a una peroxidasa (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBSt-0.2% y se añadieron 400 μl de una solución de diaminobenzidina (0.006 g en 10 ml de PBS 1X) durante 8 minutos. Después, se reveló mediante la adición de 30 μl una solución de H_2O_2 (7.5 ml de agua mili Q + 50 μl de H_2O_2), agitando ligeramente hasta observar una coloración café en el tejido. El siguiente paso fue colocar las rebanadas en un portaobjetos gelatinizado y se dejarlas secar durante 12 horas a 37 °C. Finalmente, se tiñeron las rebanadas con violeta de cresilo y se pasaron por un tren de deshidratación (EtOH 25%, EtOH 50%, EtOH 75%, EtOH 90%, EtOH 96%, EtOH 100%, Xilol 100%) y se utilizó medio de montaje DPX. Posteriormente, se obtuvieron 6 imágenes por rebanada (3 en *stratum oriens* y 3 en *stratum radiatum*) en el microscopio de campo claro y, de acuerdo a la morfología, se realizó un conteo manual de astrocitos con el software Image J.

Análisis estadístico:

Para todas las pruebas se utilizó un análisis de varianza de una vía y un test de Bonferroni como prueba *post hoc*.

RESULTADOS

- a. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas conductuales (T-maze y RON). No hubo diferencia significativa en el porcentaje de alternación en el laberinto en forma de T. De manera similar, en la prueba de RON, todos los grupos fueron capaces de discriminar entre un objeto familiar y uno novedoso. Cabe mencionar que en ambas pruebas, el grupo DAGS+S obtuvo valores más bajos en comparación con los demás grupos; sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

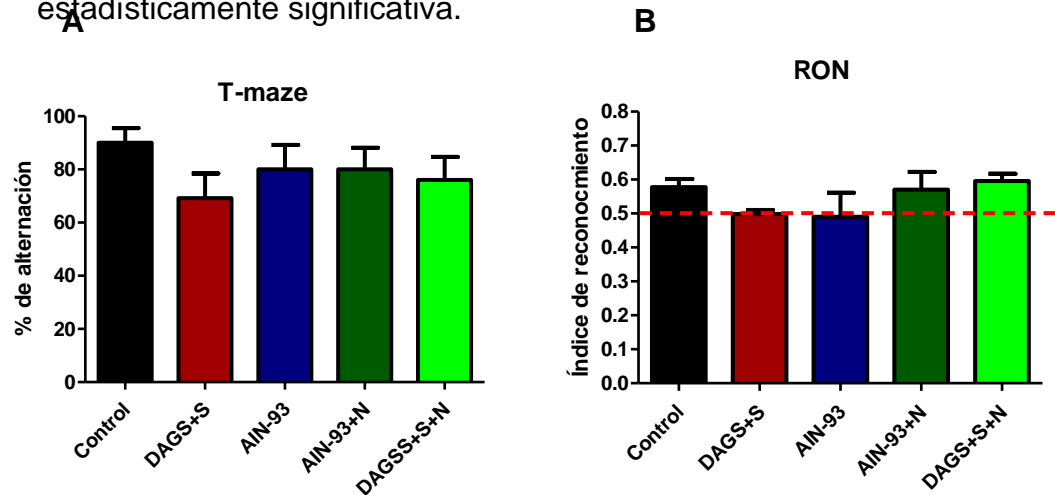


Figura 2. Efecto de la dieta sobre el porcentaje de alternación espontánea en el T-maze (A) y el RON (B). Ninguno de los grupos mostró signos de deterioro cognoscitivo, ya que obtuvieron un alto porcentaje de alternación y fueron capaces de reconocer un objeto novedoso. ANOVA de una vía.

- b. También se analizaron los cambios en la densidad de espinas dendríticas en las dendritas basales de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. En la figura 3 podemos observar que la presencia de SM produce una disminución en el número de espinas dendríticas y este efecto se revierte con una modificación en la dieta. Notoriamente, al incluir nopal en el grupo de ratas con dieta DGSA+S, el número de estas estructuras se restablece a los valores control.

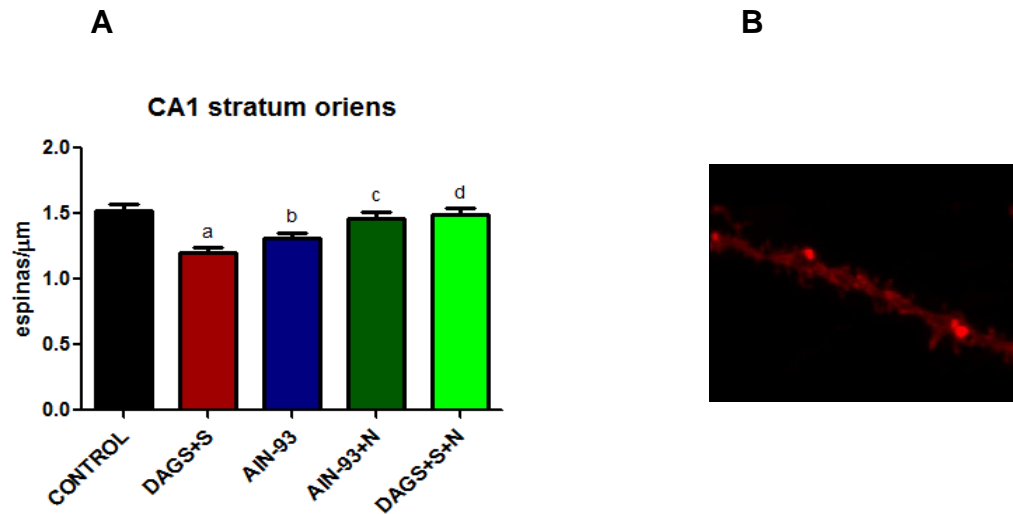


Figura 3. Efecto de la dieta sobre la densidad de espinas dendríticas. (A) El SM, inducido por una DAGS+S reduce el número de espinas dendríticas y un tratamiento con nopal revierte este efecto. a: $p<0.001$ vs control; b: $p<0.05$ vs control; c: $p<0.05$ vs DAGS+S; d: $p<0.01$ vs DAGS+S. ANOVA de una vía, Bonferroni *post hoc*. **(B)** Imagen representativa de una dendrita de las células piramidales de la región CA1 marcada con DIL.

- c. Se determinó la inmunoreactividad a GFAP, una proteína marcadora de astrocitos activos, en *stratum oriens* y *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo (figura 4).

Stratum oriens: Se puede observar que un tratamiento con una DAGS+S incrementa de manera significativa los niveles de GFAP en hipocampo y al modificar esta dieta por una control (AIN-93) el número de células positivas a GFAP disminuye de manera significativa ($p<0.001$, ANOVA de una vía, Bonferroni *post hoc*, figura 5). Por otra parte, se observó que al incluir nopal en la dieta de ratas obesas con dieta control (AIN-93) los niveles de GFAP disminuyen aún más, regresando a los valores del grupo control. Al incluir nopal en el grupo de ratas DAGS+S se redujeron significativamente los niveles de GFAP ($p<0.001$, ANOVA de una vía y Bonferroni como prueba *post hoc*, figura 5).

Stratum radiatum: De manera similar, se observó que al cambiar la DAGS+S por una dieta control, el número de células positivas a GFAP disminuye de manera significativa ($p<0.001$, ANOVA de una vía, Bonferroni *post hoc*). De igual manera, al añadir nopal en la dieta, el número de astrocitos se reduce aún más ($p<0.001$, ANOVA de una vía,

Bonferroni *post hoc*). Por otra parte, al añadir nopal a la DAGS+S se observó una disminución significativa en los niveles GFAP de manera similar al tratamiento con una dieta control ($p < 0.001$, ANOVA de una vía, Bonferroni *post hoc*).

Los resultados obtenidos en esta prueba demuestran que el nopal podría ser una opción para reducir los niveles de neuroinflamación inducida por el SM y, de esta manera, evitar el daño neuronal.

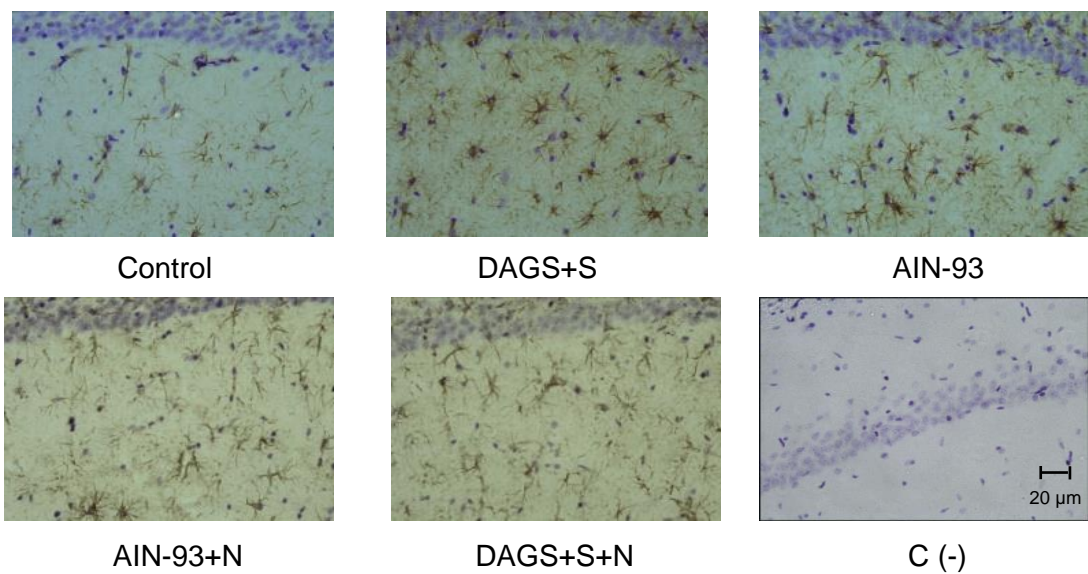


Figura 4. Efecto de la dieta sobre la inmunorreactividad a GFAP. Imágenes representativas de la IHC para GFAP (40x de aumento original) en *s. radiatum*. En café se observan las células positivas a GFAP y en morado los núcleos de las diversas poblaciones celulares en la región CA1 del hipocampo.

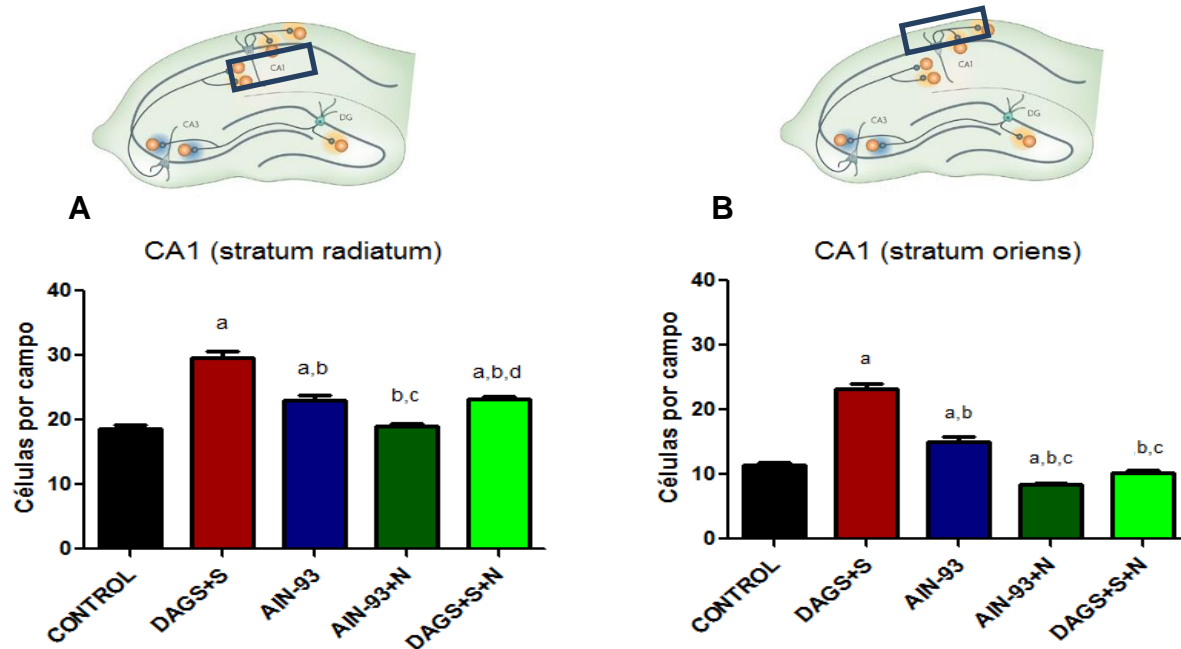


Figura 5. Efecto del nopal sobre la inmunorreactividad a GFAP en la región CA1 del hipocampo (A) s.radiatum, (B) s. oriens. La ingesta de una DAGS+S produce un incremento significativo en los niveles de GFAP y la inclusión de nopal en la dieta revierte este efecto. a: $p < 0.001$ vs control; b: $p < 0.001$ vs DAGS+S; c: $p < 0.001$ vs AIN-93; d: $p < 0.001$ vs AIN-93+N, ANOVA, Bonferroni *post hoc*).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la prueba de alternación espontánea en el laberinto en T no mostraron diferencias significativas entre los grupos DAGS+S y con tratamiento (Fig.2). El hecho de que no observáramos un deterioro cognoscitivo en el grupo de ratas alimentado con una DAGS+S (20% + 5 % de sacarosa en el agua) podría deberse a diferencias en los protocolos utilizados

Arnold y cols. (2014) demostraron que un tratamiento con una dieta alta en grasa (24%) durante 8 meses y una dieta extremadamente alta en grasa (35%) durante 17 días en ratones de 8 semanas de edad produce una disminución significativa en el porcentaje de alternación en el laberinto en T, lo cual indica la presencia de un deterioro cognoscitivo. Estos autores realizaron 18 sesiones por animal, mientras que en el actual protocolo las sesiones de prueba fueron menos (5 sesiones por animal). Además, estos autores habituaron a los animales un día antes de realizar las sesiones de prueba, reduciendo de esta manera el grado de estrés (Arnold y cols., 2014)

Por otra parte, Farr y cols., en 2008, demostraron que un tratamiento con una dieta con 10% de grasa saturada en ratones (8 semanas de edad) durante 8 meses produce un aumento en el número de errores en la prueba de evitación pasiva en el laberinto en T y en el laberinto acuático de Morris.

También, utilizando la prueba de alternación espontánea en el laberinto en Y, Kaczmarzyk y cols. (2014) demostraron que después de alimentar a un grupo de ratones de 3 meses de edad con una dieta alta en grasa (35%) durante una semana, se produce un deterioro cognoscitivo en estos animales, reflejado en una disminución en el porcentaje de alternación. De manera similar, Kosari y cols. (2012) reportaron que ratas tratadas con una dieta alta en grasa (21%) o muy alta en grasa (60%) durante 12 semanas desarrollaron un deterioro cognoscitivo detectado mediante la prueba del laberinto en Y.

La principal complicación del análisis estadístico de los datos generados a partir de grupos experimentales pequeños es el aumento en el valor de las medidas de dispersión como la desviación estándar (σ) y el error estándar (e.e.). Recordando la fórmula de ambos parámetros, $\sigma = \frac{\sum(x-\bar{x})}{n}$ y $e.e = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}$ respectivamente, podemos observar que el valor de ambos es inversamente proporcional respecto al número de la muestra (n). En este sentido, al incrementar el número de animales por grupo se podrían reducir los valores de dispersión de los datos. Dicha reducción permitiría la detección de diferencias entre tratamientos, si estas existieran. Es decir, que los grupos analizados pertenecen a poblaciones distintas (Fig. 6). Por lo anterior, podemos concluir que la principal diferencia entre los reportes anteriores y nuestro protocolo es el número de animales por grupo, donde en el actual proyecto se contó con solo 6 animales para el grupo control, 3 para el grupo DAGS+S, 4 para el grupo AIN-93, 5 para el grupo DAGS+S+N y 5 para el grupo AIN-93+N; lo cual denota la importancia de utilizar un número de animales adecuado en futuros experimentos.

De manera similar en los resultados obtenidos en la prueba de alternación espontánea en el laberinto en T, no observamos un deterioro cognoscitivo en el grupo DAGS+S en la prueba de RON (Fig. 2). Por su parte, Kaczmarzyk y cols. (2014) demostraron que después de una o 3 semanas de tratamiento con una dieta alta en grasa (35%), los ratones no fueron capaces de reconocer la presencia de un objeto nuevo. De manera similar, se ha reportado que ratones transgénicos (db/db), los cuales desarrollan SM, presentan deterioro cognoscitivo a los 8 meses de edad, el cual fue evaluado mediante la prueba de RON (Dinel y cols., 2011).

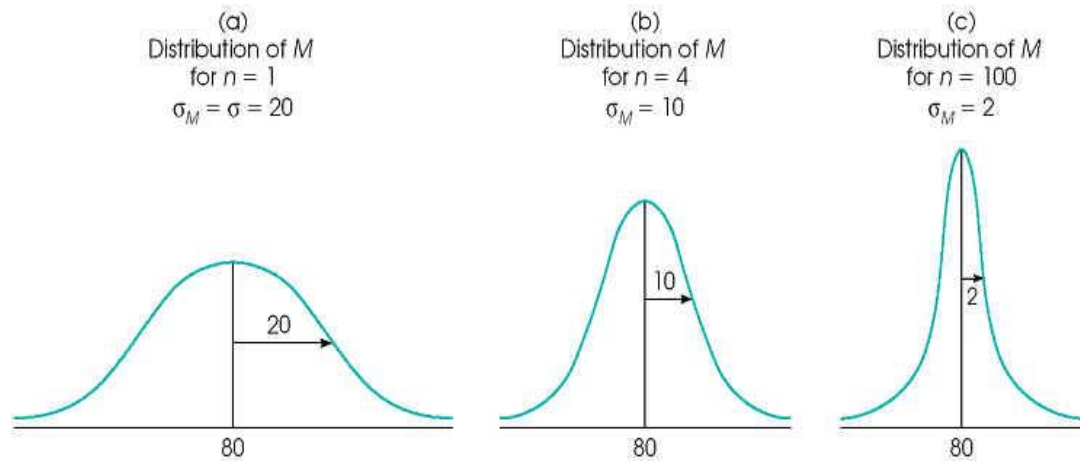


Figura 6. Efecto del tamaño de muestra (n) sobre las medidas de dispersión estadísticas. Al incrementar el tamaño de muestra, el valor de la desviación estándar disminuye.

El hecho de que no observáramos deterioro cognoscitivo en el grupo de SM podría deberse a diversos factores, como el reducido tamaño de muestra (como ya se ha discutido anteriormente) o quizás por diferencias en los protocolos utilizados. Por ejemplo, Kaczmarzyk y cols. (2014) colocaron 2 objetos idénticos en la caja del animal durante toda una noche; posteriormente, colocaron al animal en la caja de prueba junto con el mismo par de objetos durante un periodo de 5 min. Por lo tanto, podría ser que al aumentar el tiempo de exposición a los objetos familiares, sería más fácil para el animal detectar la presencia de un objeto novedoso.

Además de evaluar la integridad cognoscitiva en los grupos experimentales mediante las pruebas conductuales, decidimos analizar si había cambios morfológicos en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo a nivel de las espínas dendríticas. Estudios clínicos y en modelos animales de la EA y de SM han demostrado que ocurre una disminución en el número de estas estructuras y otros marcadores de actividad sináptica, Además, dichos cambios morfológicos son eventos tempranos en la EA y se correlacionan con problemas de memoria y aprendizaje (Heinonen y cols., 1995; Aoki y cols., 2007; Scheff y cols., 2007; Knobloch y cols., 2008).

Nuestros resultados demostraron que un tratamiento por 7.5 meses con una DAGS+S produce una disminución significativa en el número de espinas dendríticas en *s.oriens* (Fig. 3). Estos resultados son similares a los reportados por Calvo-Ochoa y cols. (2014), quienes reportaron una disminución en el número de espinas dendríticas en *s. oriens* y *s. radiatum* de las neuronas piramidales de la región CA1 en ratones tratados con una dieta alta en grasa (10%) y fructosa en el agua (20%) por 7 días. Por su parte, Stranahan y cols., (2008) reportaron que ratas bajo un tratamiento con una dieta hipercalórica (Dyets 101842; Dyets, Inc. Composición no especificada) y una solución de 20% de fructosa en agua durante 8 meses produce una disminución en el número de espinas en las dendritas basales y apicales de CA1 y un deterioro cognoscitivo evaluado mediante la prueba del laberinto acuatico de Morris.

Por otra parte, observamos que al modificar la DAGS+S por una dieta control (AIN-93) el número de espinas aumenta en comparación con el grupo DAGS+S; sin embargo, el número de estas estructuras no alcanzó los niveles control (Fig.3). Por su parte, un tratamiento con 5% de nopal en la dieta durante un mes fue capaz de revertir la pérdida de espinas inducida por una DAGS+S. Además, al tratar a las ratas con 5% de nopal, aún bajo una dieta DAGS+S, la pérdida de espinas dendríticas observado en el grupo DAGS+S se revierte.

Esto podría deberse, al menos en parte, a que la fibra del nopal reduce la absorción de grasas en el intestino al impedir la formación de micelas (Fernandez y cols., 1994). Además, se ha demostrado que el nopal reduce los niveles de GIP en plasma de pacientes mexicanos con DBT2, y reduce los picos posprandiales de glucosa e insulina (Lopez-Romero y cols., 2014). Los picos post-pandriales de glucosa se han visto relacionados con un deterioro cognitivo en pacientes con DBT2, mujeres sanas y niños (Nabb y Benton, 2006; Benton, 2008). (Nabb & Benton, 2006)

Estudios realizados en modelos animales de SM inducido por una dieta hipercalórica han demostrado que los niveles elevados de insulina en plasma

producen una resistencia a la insulina en hipocampo acompañada de un aumento en la reactividad glial y un deterioro cognoscitivo (Stranahan y cols., 2008; McNay y cols., 2010; Arnold y cols., 2014). También, se ha reportado que el aumento en la producción de AGE's aumenta en el SM y la diabetes e inhibe el crecimiento de neuritas (Girones y cols., 2004; Bennmann y cols., 2014). Por otra parte, se ha reportado que un tratamiento de dos meses con un portafolio dietario (PD) es capaz de mejorar la resistencia a la insulina en pacientes con SM. (Guevara-Cruz y cols., 2012).

De esta manera, podría ser que el efecto neuroprotector del nopal, observado como una recuperación en el número de espinas dendríticas se deba a diversos mecanismos como: 1) limitar la absorción de grasas en el intestino; 2) disminuir las concentraciones de glucosa en sangre, y por lo tanto la formación de AGE's; 3) mejorar la resistencia a la insulina a nivel periférico y de hipocampo. Sin embargo, se requieren realizar más experimentos para corroborarlo.

Además de los cambios morfológicos en las neuronas, los procesos neuroinflamatorios crónicos desempeñan un papel importante en el desarrollo de patologías como la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (McGeer y McGeer, 2010; Broussard y cols., 2012). La presencia de citocinas proinflamatorias promueve la activación de células gliales. En estado activo, se favorece la producción de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno por parte de la glia, creando un círculo vicioso que amplifica el daño neuronal. (Griffin y cols., 1998; Griffin, 2000) . Además, se ha demostrado que la neuroinflamación produce alteraciones sinápticas y deterioro cognitivo (Cagnin y cols., 2001; Rao y cols., 2012).

Los resultados obtenidos en la prueba de IHC mostraron que un tratamiento con una dieta hipercalórica durante 7.5 meses aumenta de manera significativa el número de astrocitos en *stratum oriens* y *stratum radiatum* de la región CA1 de hipocampo (Fig. 5). Estos resultados son similares a los obtenidos por Puig y cols. (2012), quienes alimentaron a un grupo de ratones

con una dieta alta en grasa saturada (21%) durante 6 semanas y, mediante un inmunoblot, observaron un aumento significativo en los niveles de GFAP en el hipocampo. De manera similar, Thirumangalakudi y cols. (2008) observaron que al alimentar a un grupo de ratones con una dieta alta en grasa saturada y colesterol (21% y 1.25% respectivamente) produce un incremento en la reactividad a GFAP, además de un incremento en el número de elecciones erróneas en la prueba del laberinto radial, lo cual es indicio de un deterioro cognoscitivo.

Por su parte, la modificación en la dieta por una DAGS+S y 5 % nopal y AIN-93 y 5% de nopal fue capaz de disminuir de manera significativa el número de células positivas a GFAP.

Se ha reportado que la inyección intraperitoneal (i.p.) de 50mg/kg de lipopolisacárido (LPS) en ratones produce un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α y un deterioro cognoscitivo siendo que éste efecto se vió revertido después de tratar a los ratones con quercetina (25, 50 y 100 mg/kg i.p.) de una manera dependiente de la dosis. Se ha reportado que los flavonoides como apigenina, luteolina, quercetina y rutina son capaces de inhibir al NF- κ B (Chen y cols., 2001). La estructura de los flavonoides les permite resistir la pérdida de un electrón al reaccionar con algunas ROS y, de esta manera evitar que estas especies interaccionen con lípidos o proteínas de la membrana celular. El nopal es un alimento funcional que contiene flavonoides y vitaminas como: kaempferol, isoramnetina, quercetina, β -caroteno y vitamina C, las cuales han demostrado que tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Medina-Torres y cols., 2011). Nuestros resultados demuestran que la inclusión de 5% de nopal en la dieta es capaz de evitar la neuroinflamación inducida por una dieta DGSA+S. Esto podría deberse a la inhibición del NF- κ B mediante los flavonoides contenidos en el nopal, reduciendo la expresión de citocinas proinflamatorias. Al disminuir los niveles de GFAP, también se podría estar reduciendo la cantidad de sustancias proinflamatorias y de ROS producidos por la glía activa.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez el efecto neuroprotector del nopal, ya que un tratamiento 5% de este alimento funcional en la dieta fue capaz de revertir la pérdida de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo y disminuyó el número de astrocitos activos en el hipocampo de ratas con SM.

CONCLUSIONES

1. La alimentación con una DAGS+S produce un aumento en los niveles de GFAP, así como una disminución significativa en el número de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo.
2. Un tratamiento con 5% de nopal durante un mes logró disminuir de manera significativa los niveles de GFAP en ratas con SM.
3. La dieta con nopal fue capaz de revertir la pérdida de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo de ratas con SM.

PERSPECTIVAS

- 1) Repetir las pruebas conductuales (T-maze y RON) con un número de muestra mayor y utilizar otros paradigmas conductuales como el laberinto acuático de Morris para evaluar el estatus cognoscitivo de los animales con SM.
- 2) Determinar los niveles de somatostatina, BDNF y APP en el hipocampo y plasma de animales con SM.
- 3) Determinar los niveles de citocinas proinflamatorias en cerebro y plasma.
- 4) Determinar los niveles de leptina en cerebro y plasma, así como cambios en la expresión de sus receptores.
- 5) Determinar el grado de resistencia a la insulina en cerebro en ratas con SM.
- 6) Analizar el efecto neuroprotector de los antioxidantes y la fibra del nopal sobre el daño cerebral inducido por una dieta hipercalórica.

Bibliografía

- ADA. (2004). Position of the ADA: functional foods. *J Am Diet Assoc* , 104, 814-826.
- Akiyama, H. et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* , 21 (13), 383-421.
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* , 15 (7): 539-53.
- Alexander, C. M., Landsman, P. B., Teutsch, S. M., & Haffner, S. M. (2003). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* , 52: 1210-4.
- Aoki, C. et al. (2007). Chemical and Morphological Alterations of Spines Within the Hippocampus and Entorhinal Cortex Precede the Onset of Alzheimer's Disease Pathology in Double Knock-In Mice. *journal of comparative neurology* , 505, 352-362.
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* , 118, 167-179.
- Arnold, S. E. et al. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of Disease* , 67, 79-87.
- ATP-III. (2001). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high cholesterol. *JAMA* , 285: 2486-2497.
- Baker, L. D. et al. (2011). Insulin Resistance and Alzheimer-like Reductions in Regional Cerebral Glucose Metabolism for Cognitively Normal Adults With Prediabetes or Early Type 2 Diabetes. *Archives of neurology* , 68 (1), 51-57.
- Ballabh, P. et al. (2004). The blood-brain barrier: an overview. *Neurobiology of Disease* , 16 (1), 1-13.
- Barde, Y. A. et al. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* , 1, 549-553.
- Beeri, M. S. et al. (2004). Diabetes mellitus in midlife and the risk of dementia three decades later. *Neurology* , 63 (10), 1902-1907.
- Bennmann, D. et al. (2014). Advanced glycation endproducts interfere with adhesion and neurite outgrowth. *Plos one* , 9 (11), e112115.

- Benton, D. (2008). Micronutrient status, cognition and behavioral problems in childhood. *Eur J Nutr* , 47 (Suppl 3), 38-50.
- Bhat, N. R., & Thirumangalakudi, L. (2013). Increased tau phosphorylation and impaired brain insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet. *J Alzheimers Dis* , 36, 781-789.
- Bittner, T. et al. (2012). Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta neuropathologica* , 124 (6), 797-807.
- Bodovitz, S., & Klein, W. L. (1996). Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* , 271 (8), 4436-4440.
- Boitard, C. et al. (2012). Juvenile, but not adult exposure to high-fat-diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *hippocampus* , 22, 1095-2100.
- Bowman, G. L. et al. (2007). Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: Stability and functional significance. *Neurology* , 68 (21), 1809-1814.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* , 82: 239-259.
- Broussard, G. J. et al. (2012). The role of inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology* , 20, 109-126.
- Bu, G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci* , 10, 333-344.
- Cagnin, A. et al. (2001). In vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* , 358, 461-467.
- Calvo-Ochoa, E. et al. (2014). Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* , 34 (6), 1001-1008.
- Carey VJ, W. E. (1997). Body fat distribution and risk of non-insulin- dependent diabetes in women: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* , 145:614-19.
- Carr, D. B., Utzschneider, K. M., Hull, R. L. et al. (2004). Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* , 53 (8):2087-94.
- Chen, Y. C. et al. (2001). Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expression by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *Cell Biochem* , 82, 537-548.

- Cook, D. G. et al. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-e4 allele. *American Journal of Pathology* , 162 (1), 313-319.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J. et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* , 261: 697-99.
- Cordy, J. M. et al. (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI- anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* , 100, 11735-11740.
- Cordy, J. M. et al. (2006). The involment of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol* , 23, 111-122.
- De Vries, H. E. et al. (1997). The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory. *Pharmacological reviews* , 49 (2), 143-156.
- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). synapse loss in frontal cortex biopses in Alzheimer's disease: corelation with cognitive severity. *Ann Neurol* , 27 (5), 457-464.
- Dinel, A. et al. (2011). Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *Plos one* , 6 (9), e24325.
- Elias, M. F., Elias, P. K., Sullivan, L. M., Wolf, P. A., & D'Agostino, R. B. (2005). Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiology of Aging* , 26S: S11-S16.
- Farooqui, A. A., Farooqui, T., Panza, F., & Frisardi, V. (2012). Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Cell Mol Life Sci* , 69:741-762.
- Farr, S. et al. (2008). Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* , 149 (5), 2628-2636.
- Farris, W. et al. (2004). Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *American Journal of Pathology* , 164, 1425-134.
- Fernandez, M. et al. (1994). Prickly Pear (Opuntia sp.) Pectin Alters Hepatic Cholesterol Metabolism without Affecting Cholesterol. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients* , 124, 817-824.
- Ford, E. S., Giles, W. H., & Dietz, W. H. (2002). Prevalence of the MetS amond US adults;findings from the third National Health and Nutrition Examniation Survey. *JAMA* , 287: 356-359.
- Freeman, L. R., & Granholm, A. C. (2012). Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *J Cereb Blood Flow Metab* , 32 (4), 643-653.

- Fried, S. K. et al. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* , 83, 847-850.
- Gendron, T. F., & Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration* , 4, 13-32.
- Girones, X. et al. (2004). N epsilon carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* , 36, 1241-1247.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M. et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* , 349: 704-06.
- Gonzalez-Chavez. (2008). Prevalencia del síndrome metabólico entre adultos mexicanos no diabéticos, usando las definiciones de la OMS, NCEP-ATPIIIa e IDF. *Rev Med Hosp Gen Mex* , 71 (1), 11-19.
- Granholm, A. C. et al. (2008). Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J Alzheimer Dis* , 14, 133-145.
- Griffin, W. S. (2000). IL-1 and the cytokine cycle in Alzheimer's disease. *J Neurochem* , 74, S52.
- Griffin, W. S. et al. (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle". *Brain Pathol* , 8, 65-72.
- Guevara-Cruz, M. et al. (2012). A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *Journal of Nutrition* , 142 (1), 64-69.
- Haffner S.M. & Cassells H.B. (2003). Metabolic syndrome - a new risk factor of coronary heart disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism* , 5: 359-70.
- Heinonen O. et al. (1995). Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. *Neuroscience* , 64 (2), 375-384.
- Hossain, P; Kavar, B; El Nahas, M;. (2007). Obesity and diabetes in the developing world-a growing challenge. *N Eng J Med* , 356: 213-15.
- Hotamisligil, G. S. et al. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* , 259, 87-91.
- IDF. (2006). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. 1-79.
- Innocenti, G. M., & Price, D. J. (2005). exuberance in the development of cortical networks. *Nature Reviews. Neuroscience* , 6 (12), 955-965.

- Iyer, R. & Tomar, S. K. (2009). Folate: a functional food constituent. *J Food Sci* , 74 (9), 114-122.
- Janson, J. et al. (2004). Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer's disease. *Diabetes* , 53, 474-481.
- Kaczmarzyk, M. et al. (2014). Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. *Psychoneuroendocrinology* , 38 (9), 1553-1564.
- Kahn, R., Ferrani, E., Buse, J. & Stern, M. (2005). The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes . *Diabetes Care* , 28:2289-2304.
- Kalmijn, S., Feskens, E. J., Launer, L. J., Stijnen, T., & Kromhout, D. (1995). Glucose intolerance, hyperinsulinaemia and cognitive function in a general population of elderly men. *Diabetologia* , 38: 1096-1102.
- Kanowski, S. & Hoerr, R. (2003). Ginkgo biloba extract EGb 761 in dementia: intent-to-treat analyses of a 24-week, multi-center, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Pharmacopsychiatry* , 36, 297-303.
- Kaplan, N. M. (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* , 149:1514-20.
- Kern, P. A. et al. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Metab* , 280, E745-E751.
- Kivipelto, M. et al. (2005). Obesity and Vascular Risk Factors at Midlife and the Risk of Dementia and Alzheimer Disease . *Arch Neurol* , 62 (10), 1556-1560.
- Knobloch, M. et al. (2008). Dendritic Spine Loss and Synaptic Alterations in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* , 37 (1), 73-82.
- Kosari, S. et al. (2012). Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behav Brain Research* , 235 (1), 98-103.
- Kupczewksa-Karczewska, M. et al. (2012). The influence of insulin infusion on the metabolism of amyloid beta peptides in plasma. *Alzheimer's and dementia* , 9 (4), 400-405.
- Le Bars, P. L. (2003). Response patterns of EGb 761 in Alzheimer's disease: influence of neuropsychological profiles. *Pharmacopsychiatry* , 36 (Suppl. 1), S50-S55.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P. et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* , 269: 973-77.

- Lopez-Romero, P. et al. (2014). The Effect of Nopal (*Opuntia Ficus Indica*) on Postprandial Blood Glucose, Incretins, and Antioxidant Activity in Mexican Patients with Type 2 Diabetes after Consumption of Two. *J Acad Nutr Diet*, *14*, 2212-2672.
- Ma, Q. L. et al. (2009). Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *Journal of Neuroscience*, *29* (28), 9078-9089.
- Matson, M. P. (2012). Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metabolism*, *16* (6), 706-722.
- McGeer, E. G. & McGeer, P. L. (2010). Manuscript, A., & Pathology, A. A. A. (2014). Degeneration in Rats, 3(2), 78–93. doi:10.4236/aad.2014.32009.Lipolysaccharide-Induced. *J Alzheimer Dis*, *19*, 355-361.
- McGeer, P. L. & McGeer, E. G. (1999). Inflammation of the brain in Alzheimer's disease: Implications for the therapy. *J Leukoc Biol*, *65*, 409-415.
- McNay, E. et al. (2010). Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiology of learning and memory*, *93* (4), 546-553.
- Medina-Torres L. et al. (2011). Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the science of food and agriculture*, *91* (6), 1001-1005.
- Mill, J. F. et al. (1985). Insulin, insulin-like growth factor II, and nerve growth factor effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *82*, 7126-7130.
- Miller, B. C. et al. (2003). Amyloid- β peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100* (10), 6221-6226.
- Moran-Ramos, S. et al. (2012). *Opuntia ficus indica* (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats. *Journal of Nutrition*, *142* (11), 1956-1963.
- Morrish NJ, W. S. (2001). Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*, *44* Suppl 2:S14-S21.
- Nabb, S. & Benton, D. (2006). The influence on cognition of the interaction between the macro-nutrient content of breakfast and glucose tolerance. *Physiol Behav*, *30*, 16-23.
- Ott, A. et al. (1996). Association of diabetes mellitus and dementia: The Rotterdam study. *Diabetologia*, *39* (11), 1392-1397.
- Ott, A. et al. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam Study. *Neurology*, *53*, 1937-1942.

- Peila, R. et al. (2002). Type 2 diabetes and the risk for dementia and related pathologies: the Honolulu-Asia aging study. *Diabetes* , 51, 1256-1262.
- Perez-Cruz, C. et al. (2011). Reduced Spine Density in Specific Regions of CA1 Pyramidal Neurons in Two Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* , 31 (10), 3926-3934.
- Phillips, H. S. et al. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* , 7 (5), 695-702.
- Pierce, L. R. et al. (1990). Myopathy and rhabdomyolysis associated with lovastatin-gemfibrozil combination therapy. *JAMA* , 264, 71-75.
- Pistell, P. J. et al. (2009). Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of Neuroimmunology* , 219, 25-32.
- Planel, E. et al. (2007). Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *Neurobiology of Disease* , 27 (50), 13635-13648.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. & Gauthier, S. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* , 342: 697-99.
- Price, J. L. et al. (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* , 58, 1395-1402.
- Puig, K. L. et al. (2012). Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *Plos one* , 7 (1), e30378.
- Qian, W. et al. (2010). PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3beta. *Journal of Alzheimer Disease* , 19 (4), 1221-1229.
- Ramon y Cajal, S. (1888). Estructura de los nervios de las aves. *Rev Trim Histol Norm Pat* , 1, 1-10.
- Rao, J. S. et al. (2012). Neuroinflammation and Synaptic Loss. *Neurochem Res* , 37, 903-910.
- Reaven, G. M. (1988). Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* , 37: 1595-1607.
- Rojas, R., Aguilar-Salinas, C. A., Jiménez-Corona, A., Shama-Levy, T., Rauda, J., Ávila-Burgos, L. et al. (2009). Metabolic syndrome in Mexican adults. Results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública* , S11-S18.
- Rothman, S. M. et al. (2012). Brain- derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. *Ann NY Acad Sci* , 1264 (1), 49-63.

- Scheff, S. W. et al. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* , 68 (18), 1501-1508.
- Scheltens, P. et al. (2012). Efficacy of Souvenaid in Mild Alzheimer's Disease: Results from a Randomized, Controlled Trial. *Journal of Alzheimer's Disease* , 31 (1), 225-236.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* , 81: 741-766.
- Shepherd, J. et al. (1995). Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* , 333, 1301-1307.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y. et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* , 375:754-60.
- Shiiki, T. et al. (2004). Brain insulin impairs amyloid beta clearance from the brain. *Journal of neuroscience* , 24, 9632-9637.
- Siddle, K. et al. (2001). Specificity in ligand binding and intracellular signaling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* , 29, 513-525.
- Sima, A. F. (2010). Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol* , 47, 279-293.
- Skoog, I. et al. (1998). A population study on blood-brain barrier function in 85-year-olds: relation to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology* , 50 (4), 966-971.
- Stiles, J. & Jernigan, T. L. (2010). The basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev* , 20, 327-348.
- Stranaham, A. M. et al. (2008). Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* , 11 (3), 309-317.
- Stranahan, A. M. et al. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *hippocampus* , 18, 1085-1088.
- Stranahan, A. M. et al. (2009). Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice. *Hippocampus* , 19 (10), 951-961.
- Thirumangalakudi, L. et al. (2008). High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *Journal of neurochemistry* , 106, 475-485.
- Torrent, L., & Ferrer, I. (2012). PP2A and Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* , 9 (2), 248-256.

- UKPDS. (1996). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome Part 1 : Worldwide definition for use in clinical practice. *Ann Intern Med* , 12: 136-45.
- Ulrich, I. H. (1987). Evaluation of a high-fiber diet in hyperlipidemia: a review. *J Am Coll Nutr* , 6, 19-25.
- Vanhanem, M. et al. (2006). Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology* , 67 (5), 843-847.
- Wahrle, S. et al. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* , 9, 11-23.
- Wang, C. et al. (1992). Effects of insulin and insulin-like growth factors on neurofilament mRNA and tubulin mRNA content in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* , 13, 298-300.
- Whitmer, R. A. et al. (2005). Obesity in Middle Age and Future Risk of Dementia: a 27 year Longitudinal Population Based Study. *BMJ* , 330, 1360.
- World Health Organization. (2012). Global data on visual impairments 2010. *Geneva, World Health Organization* .
- World Health Organization. (2014). Global Database on Body Mass Index. Available on: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>.
- Yaffe, K., Kanaya, A., Lindquist, K., Simonsick, E. M., Harris, T., Shorr, R. I., et al. (2004). The Metabolic syndrome, Inflammation, and Risk of Cognitive Decline. *JAMA* , 292 (18), 2237-42.
- Yan, S. D. et al. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the intercation of advanced glycation products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.* , 269, 9889-9897.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2002). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience* , 5, 24-34.
- Zhao, W., et al. (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* , 274, 34893-34902.