



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto de la administración de una combinación de alimentos funcionales,
sobre SIRTUINA 1 en neuronas de la corteza prefrontal de ratas obesas”**

TESIS

Que presenta

L.F. Lizbeth Pérez Jiménez

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directora de tesis:

Dra. Claudia Pérez Cruz

Ciudad de México

Febrero, 2017

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Síndrome metabólico y su efecto a nivel periférico | 1 |
| 1.2. Síndrome metabólico y su efecto a nivel central | 2 |
| 1.2.1. Regiones cerebrales mayormente afectadas por el síndrome metabólico 4 | |
| 1.3. Papel funcional de las células gliales | 5 |
| 1.3.1. Cambios en los astrocitos y microglia asociados a la obesidad | 6 |
| 1.4. ¿Qué son las Sirtuinas? | 7 |
| 1.4.1. Sirtuina 1 y su papel neuroprotector | 8 |
| 1.5. Alimentos funcionales | 10 |
| 2. Justificación | 13 |
| 3. Hipótesis | 14 |
| 4. Objetivo General | 14 |
| 4.3. Objetivos particulares | 14 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 5.3. Animales de experimentación y condiciones de alojamiento | 15 |
| 5.4. Diseño experimental | 15 |
| 5.5. Dietas empleadas | 16 |
| 5.6. Pruebas conductuales | 17 |
| 5.6.1. Laberinto en forma de T | 17 |
| 5.6.2. Reconocimiento de objeto novedoso | 19 |
| 5.7. Determinación de marcadores bioquímicos en sangre | 20 |
| 5.8. Eutanasia y manejo de los tejidos | 20 |
| 5.9. Marcaje diolístico de espinas dendríticas | 21 |
| 5.10. Medición del contenido de SIRT1 en microglia y astrocitos | 23 |
| 5.11. Inmunofluorescencia | 25 |
| 5.12. Análisis Estadístico | 26 |
| 6. Resultados | 26 |
| 6.1. Efecto de la administración de una dieta alta en grasa sobre los parámetros metabólicos en ratas adultas Wistar | 26 |
| 6.2. Alteraciones cognitivas tempranas causados por la ingesta de dieta alta en grasa en ratas Wistar adultas | 27 |
| 6.3. Efecto de un portafolio dietario sobre alteraciones bioquímicas en ratas adultas con obesidad | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 6.3.1. | <i>Niveles de glucosa en sangre</i> | 28 |
| 6.3.2. | <i>Niveles de triglicéridos en sangre</i> | 29 |
| 6.3.3. | <i>Niveles de colesterol en sangre</i> | 29 |
| 6.3.4. | <i>Peso corporal e ingesta de alimento</i> | 29 |
| 6.4. | <i>Efecto de una combinación de alimentos funcionales sobre las alteraciones cognitivas en ratas obesas</i> | 30 |
| 6.4.1. | <i>Alternación espontánea</i> | 31 |
| 6.4.2. | <i>Reconocimiento de objeto novedoso</i> | 31 |
| 6.5. | <i>Efecto de la administración de una combinación de alimentos funcionales sobre el número de espinas dendríticas en corteza prefrontal medial de ratas obesas</i> | 31 |
| 6.7. | <i>Efecto de la combinación de alimentos funcionales sobre el número de astrocitos en la corteza prefrontal de ratas obesas</i> | 35 |
| 6.8. | <i>Efecto de la combinación de alimentos funcionales sobre el número de microglia en la corteza prefrontal de ratas obesas</i> | 37 |
| 6.8.1. | <i>Cantidad total de microglia inactiva</i> | 39 |
| 6.8.2. | <i>Cantidad de SIRT 1 en microglia inactiva</i> | 39 |
| 6.8.3. | <i>Cantidad total de microglia activa:</i> | 39 |
| 6.8.4. | <i>Cantidad de SIRT1 en microglia activa</i> | 40 |
| 7. | <i>Correlaciones entre el nivel de SIRT1 y los diferentes parámetros medidos</i> | 41 |
| 8. | <i>Discusión</i> | 44 |
| 9. | <i>Perspectivas</i> | 48 |
| 10. | <i>Referencias</i> | 49 |

Índice de tablas y figuras

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabla 1. | <i>Composición de las diferentes dietas utilizadas en el presente proyecto.</i> | 17 |
| Tabla 2. | <i>Combinación de anticuerpos primarios y secundarios.</i> | 25 |
| Tabla 3. | <i>Resultados de las determinaciones bioquímicas a los cuatro meses de administración de HFD.</i> | 27 |
| Figura 1. | <i>Visión general del papel central de la resistencia a la insulina cerebral en alteraciones cognitivas y metabólicas.</i> | 4 |
| Figura 2. | <i>Localización celular, actividades enzimáticas y objetivos de las sirtuinas de mamíferos.</i> | 8 |
| Figura 3. | <i>Sirtuina 1 disminuye en la obesidad y la delción de su sitio catalítico imita las alteraciones en la memoria mostradas por ratones obesos.</i> | 9 |
| Figura 4. | <i>Importancia de SIRT1 para la arborización dendrítica.</i> | 9 |
| Figura 5. | <i>Diseño experimental.</i> | 16 |

| | |
|--|----|
| Figura 6. Esquema del laberinto en T. | 18 |
| Figura 7. Esquema representativo de un ensayo en el laberinto en forma de T. | 19 |
| Figura 8. Procedimiento esquematizado de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON) | 20 |
| Figura 9. Esquema representativo de la división de los cerebros de los sujetos de experimentación. | 21 |
| Figura 10. Imágenes representativas de las imágenes tomadas para el análisis de espinas dendríticas. | 23 |
| Figura 11. Imágenes ilustrativas de los canales utilizados para la medición de SIRT1 | 24 |
| Figura 12. Imágenes ilustrativas de cómo se realizó la cuantificación de SIRT1. | 24 |
| Figura 13. Graficas de glucosa, triglicéridos, colesterol y ganancia de peso en animales con cuatro meses de consumo de DAG + 5% S. | 27 |
| Figura 14. Porcentaje de alternación y reconocimiento de objeto novedoso a los cuatro meses de dieta DAG. | 28 |
| Figura 15. Niveles de glucosa y triglicéridos en plasma de ratas obesas. | 29 |
| Figura 16. Graficas de peso corporal e ingesta de comida durante los 7 meses de tratamiento. | 30 |
| Figura 17. Porcentaje de alternación y reconocimiento de objeto novedoso después de un tratamiento con una CAF en ratas obesas. | 31 |
| Figura 18. Número de espinas dendríticas en la corteza prefrontal medial (PFCm) de ratas obesas administradas con un portafolio dietario. | 33 |
| Figura 19. SIRT1 en la corteza prefrontal media (PFCm) de ratas obesas. | 35 |
| Figura 20. Número de astrocitos en la corteza prefrontal medial de ratas obesas. | 37 |
| Figura 21. Cuantificación de microglia total y su contenido de SIRT1. | 39 |
| Figura 22. Clasificación de microglia y cuantificación de SIRT1 en la corteza prefrontal medial de ratas adultas obesas. | 41 |
| Figura 23. Correlación de la cantidad de SIRT1 y el desempeño en el laberinto en forma de T y RON. | 42 |
| Figura 24. Correlación entre el contenido de SIRT1, el número de espinas dendríticas, número de astrocitos y el número de microglia. | 43 |
| Figura 25. Resumen grafico de la conclusión. | 47 |

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca (575218) otorgada para realizar el presente proyecto

A la **Dra. Claudia Pérez Cruz**, que me permitió formar parte de su equipo de trabajo, además de todo el interés mostrado en el proyecto de tesis, por sus valiosas aportaciones y por permitir que se generara un ambiente de continua comunicación. Doctora, muchas gracias.

A la **Dra. Nimbe Torres y Torres**, por la valiosa colaboración que nos permitió hacer con su equipo de trabajo.

A la **Mtra. Mónica Todd Sánchez** y al **QFB. Alejandro Ramírez Mirafuentes**, por su ayuda con la toma de muestra y con los análisis bioquímicos.

Al **Biologo Eduardo Garcia Osornio**, por estar al pendiente de todos los materiales que necesite durante el desarrollo del proyecto.

A mi comisión revisora

Por las críticas, comentarios, observaciones y sugerencias que enriquecieron el presente proyecto.

Al. Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza

Por sus observaciones y sugerencias, que me hicieron reflexionar y que sirvieron para enriquecer este proyecto.

Al Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca

Por sus críticas y observaciones, por estar al pendiente del desarrollo del proyecto y por estar presente en todos los seminarios a pesar de la distancia.

Quisiera agradecer de manera muy especial a mi familia, ya que durante este tiempo fuera de casa me demostraron que puedo contar con ellos para lo que sea y que siempre estarán a mi lado a pesar de la distancia.

A mi madre, que siempre ha estado al pie del cañón apoyándome y comprendiendo mi ausencia en la casa. Gracias mamá, de grande quiero ser como tú.

A mi hermana, porque a pesar de nuestras diferentes carreras y puntos de vista, siempre que la necesito sé que puedo contar con ella.

A mi padre, por el apoyo brindado en otro pasó más de mi vida.

A los grandes amigos que conocí a lo largo de este tiempo, por su gran apoyo en aquellas largas jornadas de estudio y por todas sus ocurrencias y locuras cada que nos relajábamos, muchas gracias: **Christy, Irving, Andrea, Isaac, Alan, Lorena, Suset, Tonathiu y Raúl**.

A las grandes personas que conocí al ingresar al laboratorio 32, que posteriormente se volvieron parte de mi familia, muchas gracias por su apoyo, paciencia y sus grandes enseñanzas, porque de todos me llevo un poquito. Gracias **Karina** por transmitirme esa paciencia con la que realizas tus proyectos, gracias **Juan** porque a pesar de que siempre te molestaba, cada que tenía alguna duda tú me ayudabas, gracias **Yanahi** porque de ti aprendí que la dedicación te puede llevar muy lejos y que es esencial en la vida. **Erick**, gracias por estar cuando te necesitaba, me rescataste muchas veces de quedarme fuera del laboratorio, ya sabes todas esas veces que se me olvidaban mis llaves.

Mariel y Brenda las peques del laboratorio, muchas gracias por demostrar interés, Tauqueer gracias por estar en esas largas jornadas de trabajo que teníamos en el Instituto de nutrición y por esas largas pláticas que nos hacían más ameno el día. **Brenda (mamá)** gracias principalmente por brindarme tu amistad, por hacerme sentir que en ti puedo confiar, por soportar que me desahogara contigo y por siempre tener una palabra de aliento para mí.

Aunque conviví poco tiempo en el laboratorio con ustedes también quiero agradecerles a la Dra. María del Carmen, Carlos y Daniel, gracias por su apoyo.

Resumen

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones a nivel metabólico, entre las que encontramos: obesidad abdominal, hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperglucemia y disminución en la lipoproteínas de alta densidad, se considera un problema de salud pública importante en nuestro país, ya que alrededor del 49.8 % de la población mayor de 20 años sufren SM, lo que indica que más de 17 millones de adultos en México padecen de esta enfermedad (Rojas et al., 2010). Estudios recientes han propuesto al SM representa un gran factor de riesgo para desarrollar demencia vascular e incluso la enfermedad de Alzheimer (EA). Por lo cual es de gran importancia encontrar una manera eficaz de controlar las alteraciones metabólicas que tienen lugar en el SM y así tratar de disminuir las alteraciones a nivel cognitivo.

En estudios clínicos se ha observado que la ingesta de una dieta rica en semillas, fruta, verduras y pescado protege de la aparición de EA. Sin embargo, debido a la poca accesibilidad y costo de este tipo de dietas no representa una opción para nuestra población. Los alimentos funcionales en combinaciones a manera de suplemento han mostrado una alta adherencia y eficacia para controlar diversas alteraciones metabólicas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de una combinación de alimentos funcionales a base de 5% de nopal deshidratado, 20 % de soya, 3% de aceite de chía y 1% de cúrcuma para revertir el daño cognitivo en un modelo animal de síndrome metabólico.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar adultas alimentadas con una dieta alta en grasa y 5% de sacarosa en agua (DAG + 5%S) durante cuatro meses. Al término de este tiempo se realizó el análisis de los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos para demostrar la presencia de SM, además de evaluar el desempeño cognitivo mediante pruebas conductuales (laberinto en forma de T y reconocimiento de objeto novedoso). Habiendo demostrado que los animales que ingirieron la dieta DAG + 5% S desarrollaron SM y daño cognitivo, se inició la segunda fase experimental la cual consistió en administrar una combinación de alimentos funcionales para evaluar su efecto neuroprotector. Esta fase tuvo una duración de tres meses.

Los resultados obtenidos muestran que la adición de alimentos funcionales logran revertir las alteraciones a nivel bioquímico y conductual en animales con SM. A nivel central encontramos que la CAF generó un incremento en el número de espinas dendríticas y de SIRT1, previno el incremento de astrocitos causados por la DAG y ocasionó un incremento en el número de microglia en la corteza prefrontal medial. Por lo tanto, la ingesta de alimentos funcionales podría representar una estrategia terapéutica para prevenir o revertir el daño a nivel periférico y central causado por el SM.

Abstract

The metabolic syndrome (MS) is a set of alterations at the metabolic level, among which we find: abdominal obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, hyperglycemia and decrease in high density lipoprotein, is considered a major public health problem in our country, and that about 49.8% of the population over 20 suffer from MS, indicating that more than 17 million adults in Mexico suffer from this disease (Rojas et al., 2010). Recent studies have proposed that MS represents a major risk factor for developing vascular dementia and even Alzheimer's disease. It is therefore of great importance to find an effective way to control the metabolic alterations that take place in the MS and thus try to reduce the alterations at the cognitive level.

In clinical studies it has been observed that the intake of a diet rich in seeds, fruit, vegetables and fish protects from the development of Alzheimer's. However, due to the low accessibility and cost of this type of diets does not represent an option for our population. Functional foods in combinations as supplement have shown high adherence and efficacy to control various metabolic disorders. The objective of the present study was to evaluate the effect of functional foods combination (FFC) based on 5% dehydrated nopal, 20% soybean, 3% chia oil and 1% turmeric to reverse cognitive damage in an animal model of metabolic syndrome.

Adult Wistar rats fed WITH high fat diet and 5% sucrose in water (DAG + 5% S) were used for four months. At the end of this time, glucose, cholesterol, triglycerides levels were analyzed to demonstrate the presence of MS, as well as to evaluate cognitive performance through behavioral tests (T-maze and novel object recognition). Having demonstrated that the animals that ate the diet DAG + 5% S developed MS and cognitive damage, the second experimental phase was initiated, and this consisted of administering a combination of functional foods to evaluate its neuroprotective effect. This phase lasted for three months.

The results show that the addition of functional foods can reverse biochemical and behavioral alterations in animals with MS. At the central level we found that FFC produced an increase in the number of dendritic spines and SIRT1, prevented the increase in the number of astrocytes caused by DAG and produced an increase in the number of microglia in the medial prefrontal cortex. Therefore, the ingestion of functional foods could represent a therapeutic strategy to prevent or reverse the damage at the peripheral and central level caused by the MS.

1. Introducción

La prevalencia de los trastornos metabólicos ha ido en aumento durante las últimas décadas, debido principalmente a la adopción de un estilo de vida sedentario y la ingesta excesiva de calorías. Estudios epidemiológicos recientes han proporcionado evidencia en la que pacientes con Síndrome Metabólico (SM), especialmente con adherencia crónica a dietas ricas en grasas, son más propensos a desarrollar demencia, enfermedad de Parkinson y Alzheimer. Más aún, se considera que el 10% de los casos de demencia en todo el mundo puede atribuirse a las alteraciones metabólicas asociadas al SM (Lima et al., 2016).

Diversos grupos de investigación han encontrado que la obesidad y el SM generan neuroinflamación (Thaler & Schwartz, 2010) reducción en el número de espinas dendríticas en el hipocampo y la corteza (Calvo-Ochoa, Hernández-Ortega, Ferrera, Morimoto, & Arias, 2014; Dingess, Darling, Kurt Dolence, Culver, & Brown, 2016), reducción en la tasa de neurogénesis (Boitard et al., 2014), resistencia a la insulina y daño mitocondrial (Petrov et al., 2015; Pratchayasakul et al., 2015).

Lo que lleva a sugerir que el daño a nivel cognitivo causado por la obesidad y el SM se podrían atenuar mediante la modificación de la dieta. Una opción atractiva es incluir alimentos que además del aporte nutricional puedan ayudar a en el tratamiento de una enfermedad específica (Martirosyan & Singh, 2015), este tipo de alimentos son conocidos como "Alimentos Funcionales". Por lo tanto, este proyecto propone evaluar el efecto de una dieta suplementada con alimentos funcionales para revertir los efectos negativos del SM en el cerebro y la conducta.

1.1. Síndrome metabólico y su efecto a nivel periférico

El incremento en la prevalencia del SM es un fenómeno mundial y México no es la excepción. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2006) encontró que alrededor del 49.8 % de la población mayor de 20 años sufren SM, lo que indica que más de 17 millones de adultos en México padecen de esta enfermedad (Rojas et al., 2010).

El síndrome metabólico es una recopilación de los factores de riesgo que predisponen a los individuos al desarrollo de la diabetes tipo 2 (DM2) y enfermedades cardiovasculares (ECV). El SM se describió por primera vez en 1988 por Reaven (Craig A & Forey, 2011). Desde entonces se han propuesto varias definiciones del SM, siendo una de las más utilizadas la propuesta por el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol para su Tratamiento en Adultos III, aunque la definición de la Federación Internacional para la diabetes también se utiliza con frecuencia. Según estas definiciones, se considera que los individuos tienen SM cuando cumplen por lo menos tres de los siguientes criterios (Mellendijk, Wiesmann, & Kiliaan, 2015):

- 1 Circunferencia de la cintura, como medida de la obesidad abdominal, en hombres mayor o igual a 102 cm y en mujeres mayor o igual a 88 cm.
- 2 Concentración de triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dL.
- 3 Colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) 40 mg/dL en hombres y 50 mg/ dL en mujeres.
- 4 Presión arterial mayor o igual a 130/85 mmHg.
- 5 Glucosa en ayunas mayor o igual a 100 mg/dL

1.2. *Síndrome metabólico y su efecto a nivel central*

En la última década se ha documentado ampliamente la relación entre el SM y el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, como son la diabetes tipo 2, enfermedades arterial-coronarias y cerebro vasculares y la aparición de demencia (Baumgart et al., 2015). Incluso se ha postulado que la incidencia de SM en la etapa adulta podría resultar en alteraciones metabólicas permanentes asociadas con el desarrollo de la EA.

En modelos animales se ha observado que una dieta alta en grasa produce una disminución en el número de espinas dendríticas en hipocampo, una región cerebral asociada al proceso de aprendizaje y la formación de memorias (Petrov et al., 2015).

Existe varios factores presentes en sujetos con SM han sido relacionados con la aparición del deterioro cognitivo y la demencia (Yaffe et al., 2015). Por ejemplo, la obesidad que se define como un desequilibrio entre la ingesta de energía y la cantidad de energía gastada, se relaciona con las anormalidades diabetogénicas y aterogénicas observadas en el SM (Doherty, 2011). Los adipocitos liberan activamente un gran número de adipocinas, incluyendo leptina, adiponectina, interleucinas, inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), adipsina y factores de crecimiento, así como diversas citocinas proinflamatorias. Estas citocinas puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y generar una respuesta inflamatoria en el cerebro (Mellendijk et al., 2015). Esto resulta en un incremento en la activación de los astrocitos y en la microglia, resultando así en fenómenos de neuroinflamación y un eventual daño celular y muerte neuronal (Bocarsly et al., 2015). Aunado a esto, el TNF- α también esta incrementado en la obesidad. Dentro del cerebro ejerce una gran variedad de funciones como: la neurogénesis, la transmisión sináptica y la plasticidad sináptica, sin embargo altos niveles de TNF- α se han visto asociados con problemas de aprendizaje y memoria (Butler, O'Connor, & Moynagh, 2004)

Por otra parte, las adipocinas desempeñan un amplio papel en la regulación metabólica y fisiológica de la homeostasis en el cerebro y la periferia. Las adipocinas circulantes periféricas tienen que cruzar la BHE para llegar al cerebro. Esta interacción llega a modificar la permeabilidad de la BHE ya que las adipocinas alteran el metabolismo de los lípidos, los carbohidratos y el nivel de las proteínas de esta barrera cerebral (Arnoldussen, Kiliaan, & Gustafson, 2012). Una de las adipocinas que se ven incrementadas en la obesidad es la leptina, la cual entra en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y al sistema nervioso central (SNC), al cruzar por el plexo coroidal y la BHE e interactúa con áreas específicas del cerebro como el hipotálamo e hipocampo (Zlokovic et al., 2016). Los altos niveles circulantes de leptina asociados con la obesidad finalmente producen daño en la estructura cerebral y deterioro en la memoria (Arnoldussen et al., 2012) debido principalmente a la interrupción de su vía de señalización, ya que los niveles elevados de leptina observados en la obesidad

Finalmente, algunas evidencias sugieren que los individuos obesos presentan disminución en el volumen de regiones cerebrales importantes para la cognición, como lo son: el hipocampo, la corteza prefrontal (CPF) y el cíngulo anterior (Bocarsly et al., 2015).

Otro factor del SM que se ha relacionado con alteraciones a nivel cognitivo es la hiperglucemia, que a menudo es precedida y acompañada por la resistencia a la insulina (Mellendijk et al., 2015), la cual se asocia con el desarrollo de obesidad y DMT2. Cuando el exceso de tejido adiposo está presente, tanto el hígado y los músculos se sobrecargan con ácidos grasos libres no esterificados, dando lugar eventualmente a una elevada producción de glucosa hepática y resistencia a la insulina en el músculo así como en el tejido adiposo (Craig A & Forey, 2011). La resistencia a la insulina a su vez impulsa los efectos del SM en el cerebro, probablemente debido a las anomalías asociadas en la reactividad vascular periférica y el deterioro de la función endotelial (Rusinek & Covit, 2015).

La hiperglucemia induce una variedad de cambios bioquímicos dentro de las células endoteliales de la vasculatura cerebral (Fig.1). Aquí, la glucosa se transporta continuamente desde la sangre por el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1). Como resultado, la hiperglucemia extracelular induce hiperglucemia intracelular, que constituye la base de muchas alteraciones bioquímicas encontradas en las complicaciones diabéticas como la aterosclerosis (Mellendijk et al., 2015).

La señalización tanto de la insulina como del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) desarrolla papeles importantes en la relación con la estructura y la función del cerebro, incluyendo la integridad de la mielina y la plasticidad neuronal. Las alteraciones en la insulina y la señalización de IGF interrumpen el equilibrio energético y las redes de interacción que apoyan las funciones vitales, como la supervivencia celular. La evidencia reciente apoya el concepto de que el deterioro

cognitivo y la neurodegeneración probablemente son causados por la resistencia a la insulina y al IGF(de la Monte & Tong, 2014).

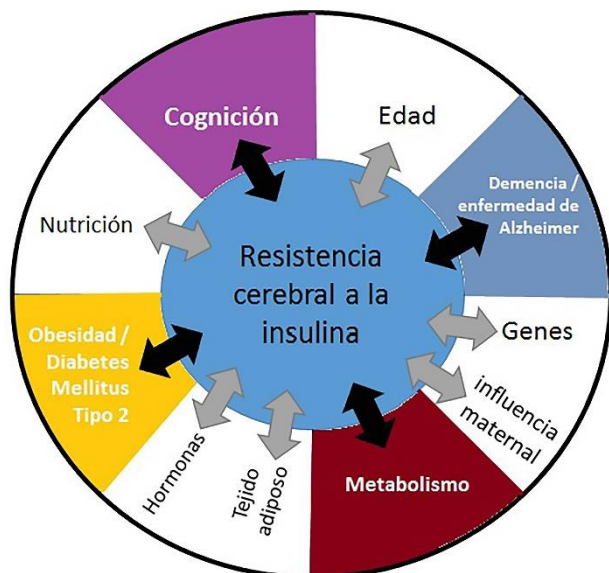


Figura 1. Visión general del papel central de la resistencia a la insulina cerebral en alteraciones cognitivas y metabólicas. La resistencia a la insulina cerebral se ha identificado en la obesidad y la DM2, así como en el envejecimiento normal y la demencia. La resistencia a la insulina cerebral se asocia con disfunciones metabólicas periféricas y con deterioro cognitivo, particularmente con respecto a la función de la memoria. Factores como el tejido adiposo, las hormonas, la nutrición, ciertas mutaciones genéticas, la nutrición y la edad están asociados con la resistencia a la insulina cerebral (Tomado y modificado de Kullmann et al., 2016).

Por otro lado, la asociación entre la hipercolesterolemia y el deterioro cognitivo sigue siendo controversial. Varios estudios demostraron que la hipercolesterolemia en la vida adulta aumenta el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer y demencia vascular, sin embargo aún no se entiende por completo como es que esto sucede (Moon, 2016). Estudios experimentales han sugerido que la distribución del colesterol en la membrana celular tiene efecto sobre el metabolismo de la proteína precursora amiloide (APP), el tráfico de APP, así como en la actividad de la β y α secretasas y la síntesis de amiloide β proteínas altamente relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (Wolozin, 2001)

Además de estas alteraciones, tanto en la obesidad como en el SM se ha visto la disminución de proteínas relacionadas con el metabolismo energético celular. Una de estas proteínas disminuidas tanto en la periferia como en a nivel central es Sirtuina 1, la cual es una proteína estrechamente relacionada con el metabolismo energético celular y recientemente se ha visto que a nivel cerebral está relacionada con: la sinaptogénesis y arborización dendrítica (Codocedo et al., 2012; Heyward et al., 2016).

1.2.1. Regiones cerebrales mayormente afectadas por el síndrome metabólico

Factores de riesgo cardiovascular y metabólico como la hipertensión y diabetes han sido relacionados en la patogénesis de la EA, así como en el desarrollo de la

demencia vascular. El SM que consiste en la agrupación de trastornos frecuentes como, obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertensión e hiperglucemia, pueden ser un factor de riesgo para la disminución cognitiva, ya que resume los efectos en conjunto de estos factores de riesgo (Yaffe et al., 2015).

Algunas evidencias sugieren que los individuos obesos muestran una disminución en el volumen total cerebral, sin embargo otros estudios muestran pérdida de volumen en estructuras cerebrales más específicas importantes para la cognición como lo son, el hipocampo y la corteza prefrontal (Bocarsly et al., 2015).

El hipocampo ejerce funciones fundamentales en procesos de aprendizaje y memoria, y es altamente sensible a cambios en la homeostasis de la glucosa y al incremento en citocinas pro inflamatorias. Se ha reportado que en modelos de SM el hipocampo presenta muerte neuronal, incremento en IL 1 β y TNF α , así como peroxidación lipídica (Treviño et al., 2015).

Por otra parte, la corteza prefrontal medial (CPFm) es una región cerebral que está involucrada en la coordinación bimanual, atención a tareas cognitivas exigentes, modulación de la excitación corporal, memoria espacial, movimiento autoiniciado y resolución de conflictos (Siddiqui, Chatterjee, Kumar, Siddiqui, & Goyal, 2008), también se ha visto afectada por las alteraciones metabólicas.

Se ha observado que ratas sometidas a una dieta alta en grasa durante dos meses presentaban una disminución en el número de espinas dendríticas en la CPFm, así, como una reducción en marcadores tanto pre-sinápticos como post-sinápticos en la misma región cerebral (Bocarsly et al., 2015). Además la actividad metabólica de la corteza prefrontal disminuye en sujetos obesos, esto al ser comparados con sujetos delgados (Val-laillet, Layec, Guérin, Meurice, & Malbert, 2009). La CPFm se ha visto relacionada con la flexibilidad cognitiva, modulación de conductas compulsivas y control visceromotor. Por lo tanto, es importante conocer las alteraciones de los diferentes tipos celulares presentes en esta región, ya que nos ayudaría a entender las afecciones cognitivas tras la ingesta de dietas altas en grasa.

1.3. *Papel funcional de las células gliales*

Las células del sistema nervioso se dividen en dos clases principales: las neuronas y la glía. Las células gliales a su vez se clasifican en tres tipos principales: astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Los astrocitos y oligodendrocitos, llamados macroglia, son generados por progenitores neurales multipotentes que constituyen el neuroepitelio que recubre el tubo neural. Las células microgliales son fagocitos que combaten procesos degenerativos e infecciones en el tejido neural. Se derivan de la formación de sangre de células madre (hematopoyéticas) que migran en el

sistema nervioso durante el período embrionario (Omoto, Lovick, & Hartenstein, 2016).

Los astrocitos son los el tipo de célula glial del sistema nervioso central más abundante y resultan esenciales para la homeostasis del cerebro ya que le proporcionan metabolitos y factores de crecimiento a las neuronas, apoyan la formación de sinapsis y la plasticidad neuronal, así como también se encargan de regular el equilibrio extracelular de iones metálicos y de neurotransmisores (Colombo & Farina, 2016). Gracias a su ubicación estratégica en estrecho contacto con las células del SNC residentes (neuronas, oligodendrocitos y microglia) y los vasos sanguíneos, los astrocitos participan en el intercambio de nutrientes en la barrera hematoencefálica. También juegan un papel en el control del tráfico de células inmunes y su activación. Por otra parte, los astrocitos son células inmunes competentes capaces de detectar señales de peligro, responder a través de la secreción de citocinas y quimiocinas, y activar la immuno-defensa adaptativa (Cordiglieri & Cinthia, 2010).

La microglia es generalmente considerada como las células inmunes del SNC y representa el 10% de la población total de células gliales en todo el cerebro (Luo & Chen, 2012). La microglia contribuye a la homeostasis del cerebro. A causa de sus diferentes estados de activación, la microglia puede regular la inflamación, la reparación y la regeneración del tejido cerebral. Las funciones microgliales son modulados por varios actores celulares, tales como neuronas, astrocitos, células T y la barrera hematoencefálica (González, Elgueta, Montoya, & Pacheco, 2017). En el cerebro sano, la microglia se caracteriza por una morfología ramificada con protuberancias citoplasmáticas largas. Sin embargo, después una lesión, la microglía puede cambiar de un estado de reposo a activada, proliferar, y moverse a la zona dañada (Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhratsky, 2011).

1.3.1. Cambios en los astrocitos y microglia asociados a la obesidad

Se ha reportado que en modelos de roedores alimentados con una dieta alta en grasa se presenta un proceso de astrogliosis, lo cual puede ser derivado por el incremento de óxido nítrico que tiene lugar en condiciones de neuroinflamación. Altos niveles de óxido nítrico pueden influir negativamente en la plasticidad sináptica, inducir la muerte celular y producir neurodegeneración (Gziel et al., 2016).

Respecto a la microglia, Bocarsly y colaboradores en 2015 mostraron que en un modelo de obesidad inducida por dieta en ratas, que las células microgliales presentaban un incremento en la longitud de sus procesos de manera selectiva en la corteza prefrontal, corteza peririnal y del hipocampo. Este incremento en las ramificaciones podría referirse a una activación microglial (Streit 2004).

Estos datos nos indican que las alteraciones metabólicas observadas en sujetos con obesidad y síndrome metabólico producen cambios a nivel neuroanatómico y

cognitivo. Lo que sugiere que también el cerebro está siendo afectado por los altos niveles de glucosa y colesterol presentes en la mayoría de estos casos. Aun no se sabe cómo estos cambios periféricos afectan las funciones cognitivas. Para poder entender la relación entre el estado metabólico neuronal y las funciones cognitivas, se pueden analizar los niveles de las enzimas sirtuinas, como se describirá a continuación.

1.4. ¿Qué son las Sirtuinas?

Las Sirtuinas (SIRT) o reguladores silenciosos de la información de la transcripción de genes, son una familia de enzimas que se expresan a través de toda la vida. Evidencias experimentales indican que esta única clase de desacetilasas de histona son reguladores clave de numerosos procesos fisiológicos (Fig. 2), en particular en envejecimiento en múltiples organismos (Braidy et al., 2015).

La familia de sirtuinas incluye 7 proteínas, las desacetilasas /ADP ribosil transferasas que actúan en un amplio rango de procesos en el núcleo, citoplasma, mitocondria en modificaciones post-traduccionales (SIRT 1, 2, 3 y 5) y ADP-ribosilación en el DNA (SIRT 4 y 6) (Finkel, Deng, & Mostoslavsky, 2009). Las sirtuinas en su totalidad son dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺).

Como ya se había mencionado, las sirtuinas están asociadas a numerosos procesos fisiológicos como: regular el desarrollo, el metabolismo energético, la formación de la heterocromatina, la segregación cromosómica, diferenciación celular, apoptosis, longevidad y la transcripción (por silenciamiento), reparación y recombinación de DNA (Yamamoto, Schoonjans, & Auwerx, 2007).

Las sirtuinas presentan un dominio catalítico conservado pero difieren en las secuencias cercanas a éste. Su localización subcelular es diferente: Las sirtuinas SIRT1, SIRT2, SIRT6 y SIRT7 se encuentran principalmente en el núcleo. Sin embargo SIRT1 también se puede localizar en el citoplasma, mientras que SIRT6 y SIRT7 se observa predominantemente en regiones heterocromáticas y en el nucléolo, respectivamente. Las SIRT3, SIRT4 y SIRT5 son mitocondriales pero han sido descritas también en el núcleo (Mockus-sivickas, 2010).

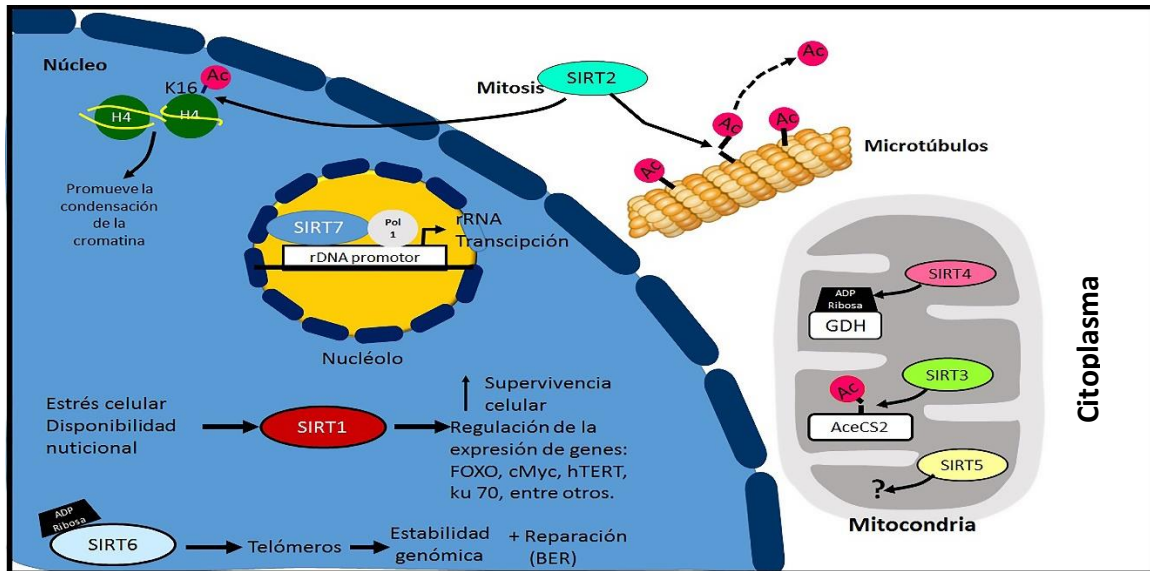


Figura 2. Localización celular, actividades enzimáticas y objetivos de las sirtuinas de mamíferos. SIRT1 responde a los cambios en la disponibilidad de nutrientes y el estrés celular para promover la supervivencia celular mediante la desacetilación de histonas y dianas no histonas en el núcleo. SIRT2 se localiza principalmente en el citoplasma y desacetila α -tubulina, pero durante la mitosis, se traslada al núcleo y desacetila la histona H4-K16 para promover la condensación de la cromatina. SIRT2 puede funcionar como parte de un control mitótico para garantizar que las células no pasen a través de la mitosis si una señal de estrés o daño al ADN está presente. SIRT3, 4 y 5 se localizan en la mitocondria. SIRT3 desacetila y activa acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) para mejorar la producción de acetil-coA. SIRT4 ADP-ribosilata y reprime la glutamato deshidrogenasa (GDH) para suprimir la señalización de la insulina. No se han identificado objetivos ni actividad enzimática para SIRT5. SIRT6 promueve la reparación del ADN y protege contra la inestabilidad genómica en el núcleo. SIRT7 se localiza en el nucléolo donde interactúa con el ARN Pol-I para promover la transcripción de genes de ARNr (Tomado y modificado de Saunders & Verdin, 2007).

1.4.1. Sirtuina 1 y su papel neuroprotector

Recientemente se ha propuesto que SIRT1 es un regulador epigenético que desempeña un papel central en la patogénesis de la obesidad, pero también está ligada al deterioro de la memoria (Heyward et al., 2016). Esto fue demostrado al utilizar un modelo de ratón knock-out para SIRT1 en el cual la delación del dominio catalítico de SIRT1 provocó daño en la memoria similar a los mostrados en los ratones obesos, demostrando así, que la disminución en SIRT1 es suficiente para recapitular los trastornos de la memoria ligada a la obesidad. Por el contrario, la administración de un activador de SIRT1, el resveratrol, evitó la manifestación del daño en los procesos de memoria en ratones obesos, evidenciando que la disminución en la función de SIRT1 es una característica patogénica central del deterioro de la memoria inducido por la dieta alta en grasas (Fig. 3).

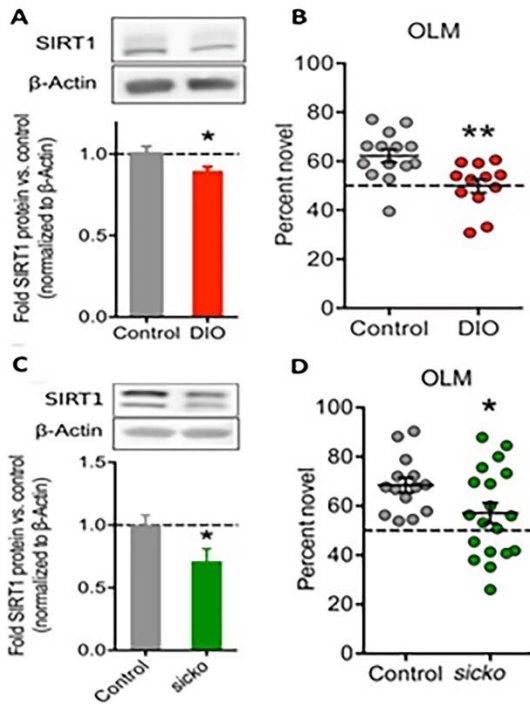


Figura 3. Sirtuina 1 disminuye en la obesidad y la delción de su sitio catalítico imita las alteraciones en la memoria mostradas por ratones obesos. En A se muestra la cantidad de SIRT 1 en ratones control (gris) y en ratones obesos (rojo) y en B se muestra el desempeño de los animales en la tarea de Memoria de Ubicación de los Objetos (OLM sus siglas en inglés) y podemos observar que los animales obesos exhiben un menor desempeño en comparación al grupo control. En C se muestra el nivel de SIRT 1 en un modelo transgénico con delción del sitio catalítico y en D se muestra el desempeño de los animales en la tarea de Memoria de Ubicación de los Objetos y como se puede observar, con la delción del sitio catalítico de SIRT 1 el desempeño de los animales en dicha tarea disminuye como en el grupo obeso. Tomado y modificado de (Heyward et al., 2016).

Por otro lado, también se ha visto que SIRT1 es esencial para la arborización dendrítica, lo cual fue demostrado por Codocedo y colaboradores en el 2012, en este estudio, se evaluó el papel de SIRT1 en el desarrollo dendrítico en cultivo de neuronas hipocampales que se transfectaron a los 3 días *in vitro* con un constructo que codifica SIRT1 o para el dominante negativo SIRT1H363Y, que carece de actividad catalítica. Las neuronas que sobre-expresan SIRT1 mostraron una mayor arborización dendrítica, mientras que las neuronas que sobre-expresan SIRT1H363Y mostraron una reducción en la complejidad dendrítica (Fig.4).

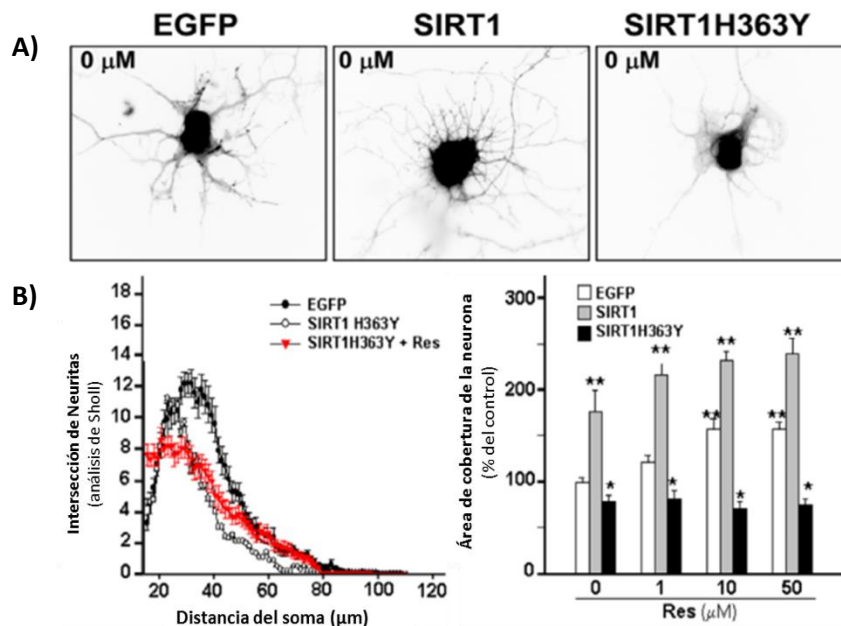


Figura 4. Importancia de SIRT1 para la arborización dendrítica. En A se muestran microfotografías de neuronas control, que sobre-expresaban SIRT1 y neuronas con la dominante negativa. En B se muestra el análisis de Sholl y el área de cobertura neuronal, en donde podemos observar que las neuronas que tenían la dominante negativa muestra una pobre arborización en comparación a las neuronas control y a las que sobre-expresaban SIRT1. Tomado y modificado de (Codocedo et al., 2012).

Además de estos estudios realizados tanto en modelos animales así como en cultivos celulares, Julient y cols. decidieron investigar la regulación de SIRT1 y su relación con la progresión del Alzheimer: Estos autores investigaron las relaciones entre la proteína SIRT1 del cerebro y las concentraciones de su mRNA y los compararon con diversos índices neuropatológicos, bioquímicos y clínicos disponibles para identificar correlaciones significativas en muestras de cerebro post mortem de personas con el diagnóstico neuropatológico de Alzheimer. Los niveles de SIRT1 también se estudiaron en una segunda cohorte dividida en tres grupos basados en la evaluación antemortem detallada de la función cognitiva como: ausencia de deterioro cognitivo (NCI), deterioro cognitivo leve (MCI) o AD. Los resultados mostraron que una de las regiones del cerebro donde se observaron mayores pérdidas de proteína SIRT1 y su mRNA fue la corteza cerebral. En el hipocampo, se encontraron disminuidos los niveles de SIRT1 específicamente en regiones como el CA1 y CA3, pero no en el giro dentado. Curiosamente, las subregiones CA1 y CA3 del hipocampo son el sitio diana de las neuronas proyectadas de la corteza entorrinal, las cuales están entre las primeras en desarrollar marañas neurofibrilares de la proteína tau, lo que indica que SIRT1 disminuye en regiones del cerebro afectadas durante el curso del Alzheimer (Julien et al., 2010).

Con toda esta información SIRT1 se posiciona como una proteína muy importante para el estudio de la relación que existe entre los problemas metabólicos asociados con el daño cognitivo, por lo que encontrar una forma segura de incrementar la actividad y la cantidad de esta proteína pudiera ser una buena estrategia para prevenir o revertir la aparición de demencias.

1.5. Alimentos funcionales

En décadas recientes ha habido un gran interés en desarrollar terapias que nos permitan prevenir enfermedades crónicas como la obesidad y alteraciones metabólicas, y al parecer la nutrición ha tomado un papel fundamental en este ámbito (Zare & Hosseinkhani, 2016). Se ha demostrado que muchos alimentos tradicionales como la chía, el nopal, la soya, la cúrcuma entre otros, aparte de aportar nutrientes de gran utilidad, producen beneficios a la salud de quien los consume (Avila-Nava et al., 2016; Serralde-Zúñiga et al., 2014).

Estos alimentos son conocidos como funcionales ya que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar (Serra & Aranceta, 2002).

El nopal, un vegetal tipo cactácea nativo de México, se ha utilizado durante mucho tiempo en la cocina tradicional mexicana y la medicinal. Este vegetal contiene fibra soluble (mucílago y pectina) y fibra insoluble (celulosa, hemicelulosa, lignina) y también contiene beta-carotenos, polifenoles y vitamina C con actividad antioxidante (Stintzing & Carle, 2005). En la actualidad, el nopal se utiliza comúnmente como medicina complementaria y alternativa de la población hispana debido a su efecto anti-hiperglucémico en sujetos con diabetes tipo 2 (López-Romero et al., 2014). Se ha observado que animales obesos alimentados con nopal logran disminuir la esteatosis hepática y el estrés oxidativo mediante el aumento de la concentración de adiponectina, que a su vez regulan al receptor de peroxisoma-proliferador-activado alfa (PPAR- α) involucrado en la oxidación de ácidos grasos (Moran-Ramos et al., 2012).

La chía, que también es rica en fibra y minerales, era un componente importante de la dieta de los mayas y los aztecas. Que contiene ácidos grasos omega 3, omega 6 en una proporción 3:1, ácido alinolénico, y ácido linoleico, entre otros (Porrás-Loaiza, Jiménez-Munguía, Sosa-Morales, Palou, & López-Malo, 2014). La semilla de chía ha recibido una creciente atención por su posible papel en la prevención de la dislipidemia. En este sentido, algunos estudios con animales han demostrado una reducción de triacilglicerol (TAG) (Chicco, D'Alessandro, Hein, Oliva, & Lombardo, 2009), así como del colesterol total y un aumento de HDL-colesterol en plasma cuando este ingrediente alimentario se utilizó como fuente de grasa de la dieta en ratas normales o dislipidémicas (Andrea S. Rossi et al, 2013).

Por otro lado existen diversos estudios realizados en seres humanos y animales establecen que la ingesta de proteína de soya en la dieta reduce los niveles de triglicéridos y colesterol total en plasma (Carroll & Kurowska, 1995); Sin embargo aún no se conoce a ciencia cierta los mecanismos moleculares que ayudan a la disminución de triglicéridos y del colesterol en plasma tras la ingesta de este cereal. Entre los mecanismo propuestos se sabe que la soya incrementa la excreción de ácidos biliares, produce cambios en la relación insulina-glucagon y produce cambios en el metabolismo del colesterol (Potter, 1995).

Finalmente la *cúrcuma longa* es una planta de origen asiático cuyo rizoma, de color naranja vivo bajo una fina película marrón clara, es usado comúnmente como una especia en la cultura asiática, donde está considerada como una planta mágica dadas sus características organolépticas y sus indudables propiedades terapéuticas y protectoras, sobre todo a nivel hepático y cutáneo (Mesa C, et al., 2000).

La investigación científica reciente revela que la curcumina, principio activo de la cúrcuma, interactúa directamente con el tejido adiposo blanco para reducir la infiltración inflamatoria de los macrófagos, para frenar la síntesis adipocina inflamatoria, y para aumentar la producción de adipocitos adiponectina (Wang et al, 2009; Woo et al, 2007;. Xie et al, 2012). Por otra parte, la curcumina puede promover el efecto antioxidante y mejorar la intolerancia a la glucosa en ratones alimentados con dieta alta en grasa (He et al., 2012). Más aún, se ha comprobado que la

curcumina interactua con la formación de placas amiloideas presentes en modelos transgénicos del Alzheimer (Shi et al., 2013).

A pesar de tan grandes bondades de estos alimentos, su baja biodisponibilidad individual es una gran limitante (Allegra et al., 2015; Stanić, 2016), por lo que se ha pensado que una mejor forma de administrarlos es conjuntamente, ya que se espera un sinergismo en su actividad benéfica para la salud.

2. Justificación

De acuerdo a la asociación contra el Alzheimer, se pronostica que México será de los países en desarrollo con mayor incremento en los índices esta enfermedad debido al creciente número de personas con obesidad (Alzheimer Association, 2010; Dilworth-Anderson et al., 2008). Por lo tanto, es de crucial importancia proponer alternativas terapéuticas que disminuyan los riesgos asociados a enfermedades metabólicas, principalmente las relacionadas con una mala alimentación.

Existen varios alimentos completos que poseen importantes efectos benéficos a nivel genómico y expresión de proteínas relacionadas con la tasa metabólica y mejoras bioquímicas. Dichos alimento se conocen como alimentos funcionales, los cuales no presentan ningún efecto secundario, son de fácil acceso para la población y tienen una alta adherencia. El uso de estos alimentos podría ofrecer una alternativa terapéutica para disminuir el efecto de las alteraciones metabólicas inducidas por la obesidad y el riesgo de desarrollar demencias en edades avanzadas. Hasta el momento no se ha reportado el efecto de los alimentos funcionales sobre la presencia de SIRT1 en corteza prefrontal ni su efecto en la capacidad cognitiva de ratas obesas.

3. Hipótesis

La combinación de alimentos funcionales será capaz de modular la presencia de SIRT1 en la corteza prefrontal de manera diferencial al tipo celular, resultando en un efecto neuroprotector en ratas obesas.

4. Objetivo General

Demostrar que la combinación de alimentos funcionales (CAF) puede revertir el daño cognitivo causado por una dieta alta en grasa saturada y sacarosa al modular la presencia de SIRT1 en la corteza prefrontal de rata.

4.3. Objetivos particulares

1. Evaluar los cambios bioquímicos y cognitivos en ratas obesas y alimentadas con una CAF.
2. Analizar los cambios en el número y tipo de espinas dendríticas en corteza prefrontal de ratas obesas y alimentadas con una CAF.
3. Determinar la presencia de SIRT1 en astrocitos y microglia de la corteza prefrontal de ratas obesas, control y ratas alimentadas con una CAF.
4. Evaluar la correlación entre la presencia de SIRT1 y el daño cognitivo en ratas obesas alimentadas con una CAF.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3. Animales de experimentación y condiciones de alojamiento

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 2 meses de edad (250 ± 20 g) del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, quienes fueron manejadas de acuerdo la Norma Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999. Los animales se alojaron en cajas de acrílico transparente de forma individual y se mantuvieron en condiciones de ciclos luz/oscuridad de 12 hrs, con acceso a agua y comida *ad libitum*.

5.4. Diseño experimental

El diseño experimental se realizó en dos etapas que a continuación se describirán (Fig. 5):

Etapas 1. Inducción a la obesidad y alteraciones metabólicas

Se utilizaron 33 ratas macho de la cepa Wistar con una edad aproximada de 2 meses y un peso de 250 ± 20 g, las cuales fueron divididas en dos grupos:

- 1) Control; recibió dieta estándar (AIN- 93) (n=10)
- 2) Dieta alta en grasa (21%) + 5% de sacarosa en el agua (DAG + 5% S) (n= 23)

Durante los primeros cuatro meses los animales fueron alimentados con las dietas antes mencionadas *ad libitum*. En este tiempo se monitorizo la ganancia de peso además se midieron parámetros metabólicos como niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol. Posteriormente se les realizaron pruebas conductuales (laberinto en forma de T y reconocimiento de objeto novedoso, RON).

Etapas 2. Tratamiento con alimentos funcionales

Una vez con los resultados tanto de las pruebas metabólicas como cognitivas y al ver que los resultados mostraban alteraciones se dio inicio de la dieta experimental, a base de una combinación de alimentos funcionales (CAF) que contiene 5% nopal deshidratado 20% texturizado de soya, 3% de aceite de chía y 1% cúrcuma longa, quedando entonces los siguientes grupos:

- a. Animales con dieta control AIN-93 (n= 10).
- b. Animales obesos que continuaron con dieta DAG + 5% S (n= 8).
- c. Animales obesos que continuaron con DAG + 5% S y se les adicionó la combinación de alimentos funcionales: DAG + 5% S + CAF (n= 6).
- d. Animales que los primeros 4 meses consumieron DAG + 5% S y que se regresaron a dieta control: AIN – 93 + 5% S (n= 4).

e. Animales que los primeros 4 meses consumieron DAG + 5% S y que se regresaron a dieta control pero además se les adicionaron los alimentos funcionales: AIN – 93 + 5% S + CAF (n= 5).

Estos grupos fueron mantenidos durante otros tres meses en este régimen. Al final del tratamiento (a los 9 meses de edad) se realizaron pruebas cognitivas (laberinto en T y RON) así como pruebas metabólicas: determinación de los niveles de glucosa, de triglicéridos y de colesterol así como el control de peso. Una semana después los animales fueron sacrificados por decapitación y se obtuvo el cerebro (hemisferio derecho) el cual se post-fijo en paraformaldehído (PFA) al 4% (PFA) durante 4 horas para el caso del marcaje diolístico y 48 horas para la inmunohistoquímica contra SIRT1 así como para realizar dobles marcajes con GFAP (marcador de astrocitos) e Iba-1 (marcador de microglia).

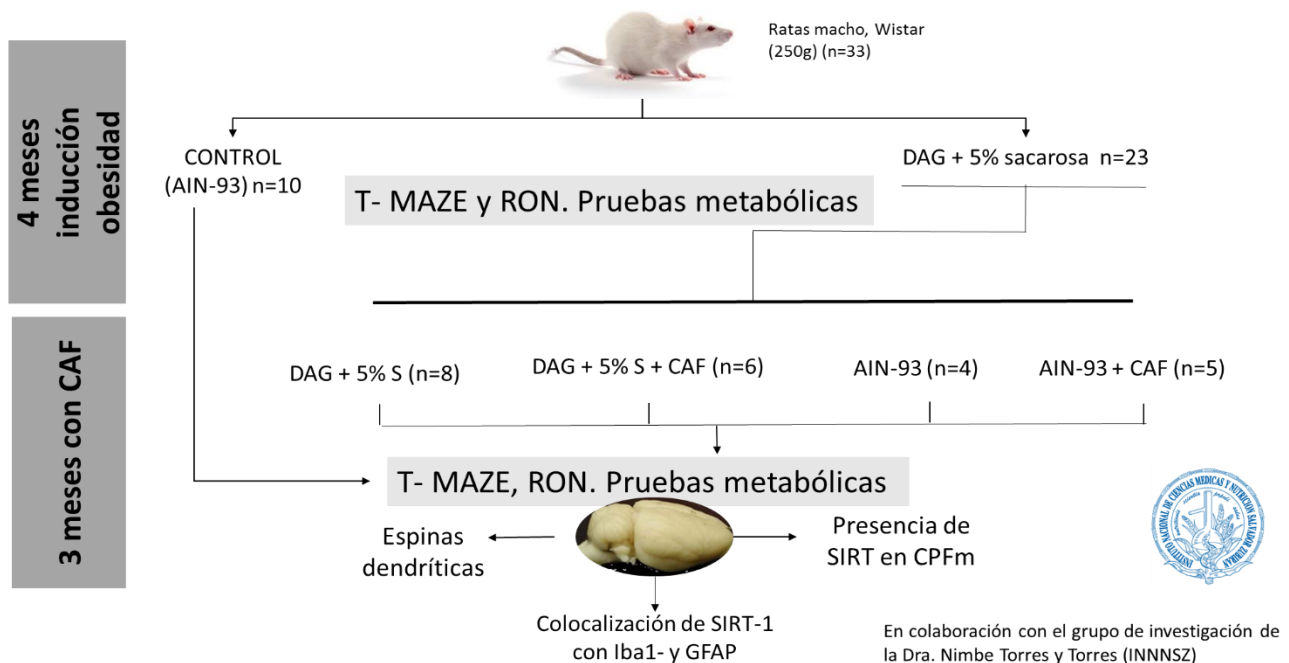


Figura 5. Diseño experimental. Representación esquemática del diseño experimental seguido en este proyecto de maestría.

5.5. Dietas empleadas

La composición de la dieta AIN-93 (control), DAG, DAG + CAF Y AIN-93 + CAF se muestra en la Tabla 1. Las dietas se administraron en forma seca y se ajustaron a la recomendación de la AIN-93. La CAF también fue ajustada a la dieta AIN-93, descontando de la formulación original 20% de soya, 5% de nopal deshidratado, 20% de aceite de chía y 1% de cúrcuma. La DAG se preparó como se describe en (Rodríguez-Rodríguez et al., 2015) con la adición de un 5% de sacarosa en el agua.

| Nutrientes | Fuente | AIN-93 | AIN-93 +CAF | DAG | DAG + CAF |
|-------------------------------|------------------|--------|-------------|--------|-----------|
| Carbohidratos | Almidón | 39.7 | 38.7 | 39.7 | 38.7 |
| | Maltodextrosa | 13.3 | 13.3 | 13.3 | 13.3 |
| | Sacarosa | 10 | 10 | 5 | 5 |
| | Cúrcuma | - | 1 | - | 1 |
| Proteínas | Caseína | 20 | - | 24 | 4 |
| | Soya | - | 20 | - | 20 |
| Lípidos | Aceite de Soya | 7 | 4 | 7 | 4 |
| | Aceite de Chía | - | 3 | - | 3 |
| | Manteca | - | - | 20 | 20 |
| Fibra | Celulosa | 5 | - | 5 | - |
| | Nopal | - | 5 | - | 5 |
| Vitaminas y Minerales | Mix de vitaminas | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| | Mix de minerales | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | L-Cisteína | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| | Colina | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| | TBHQ | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 |
| Contenido Energetico (kcal/g) | | 3.9 | 3.9 | 5.7 | 5.7 |

Tabla 1. Composición de las diferentes dietas utilizadas en el presente proyecto. Las dietas cumplen con los requerimientos nutricionales establecidos por el Instituto de Nutrición de América. Los datos mostrados son g/100g.

5.6. Pruebas conductuales

Las pruebas utilizadas en el presente proyecto fueron el laberinto en forma de T y el reconocimiento de objeto novedoso, las cuales permiten la evaluación de la memoria a corto plazo, en específico la memoria de trabajo.

5.6.1. Laberinto en forma de T

El laberinto en forma de T consiste en un aparato que tiene un brazo vertical (zona de inicio) que se bifurca en dos brazos más en forma de T (zona de elección); en la entrada de cada brazo, se encuentra una compuerta. En el punto donde interceptan los tres brazos se localiza la zona media y una división central (Figura 6).

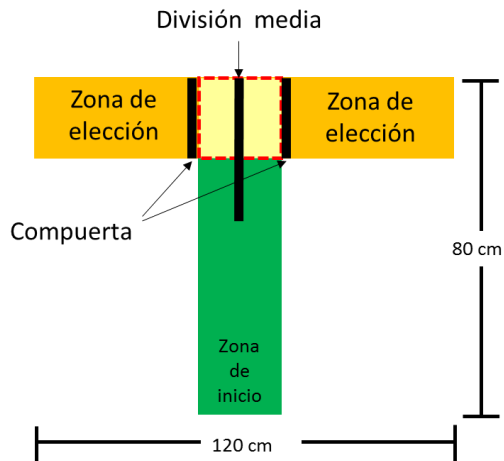


Figura 6. Esquema del laberinto en T.

El laberinto en forma de T es una prueba que se basa en la alternancia espontánea y en el comportamiento explorador de los roedores. Lo que se mide es el número de aciertos con respecto al total de sesiones (% alternación), el tiempo que tarda el animal en entrar al brazo de elección (latencia) y la duración en la zona media, con estos parámetros, logramos tener medidas aceptables, para evaluar la memoria de trabajo de los animales de experimentación (Deacon et al., 2006).

El procedimiento que se utilizó para realizar esta prueba fue el siguiente:

Siempre antes de cada ensayo se limpió el laberinto en forma de T con una solución de etanol al 75%, después se esparció aserrín similar al que los animales de experimentación tenían en sus cajas de confinamiento y se colocó la división central.

Después se colocó el animal de experimentación en el brazo de inicio, de espaldas a los brazos de elección y se le permitió elegir libremente alguno de los brazos, dándole un tiempo máximo de 90 segundos para hacerlo, en esta fase se le conoce como de prueba. Una vez que el animal eligió algún brazo es confinado en él durante 30 segundos, esto al cerrar la compuerta del brazo elegido. Al término de este tiempo se retiró la compuerta de ese brazo y se dirigió al animal de experimentación al brazo de inicio donde fue retirado y colocado en su caja de confinamiento durante 2 minutos.

Mientras este tiempo transcurría el aserrín del laberinto en forma de T fue revuelto y esparcido nuevamente en él, con el fin de evitar pistas de olor y la división media fue retirada.

Transcurridos los 2 minutos el animal de experimentación fue colocado nuevamente en el brazo de inicio de espaldas a los brazos de elección y se le permitió la libre elección entre los dos brazos, esta fase corresponde a la de elección.

Se realizaron 3 ensayos por día, durante 2 días, completando un total de 6 ensayos por animal. El % de alternación fue analizado.

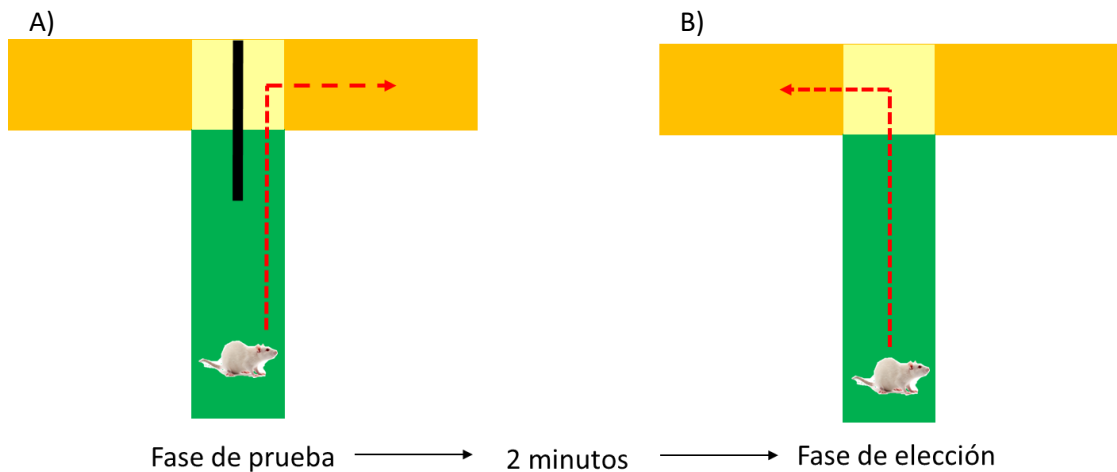


Figura 7. Esquema representativo de un ensayo en el laberinto en forma de T. Se muestran las dos fases que tienen lugar en la realización de un ensayo, en A) podemos observar que en la fase de prueba está presente la división media que le muestra al animal que tiene dos opciones mientras que en B) que corresponde a la fase de elección esta división ya no se encuentra presente.

5.6.2. Reconocimiento de objeto novedoso

Esta prueba se basa en la tendencia espontánea de los roedores a pasar mayor tiempo explorando un objeto novedoso en comparación a un objeto que le es familiar.

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso se realizó en dos días, el día 1 fue la habituación de los animales a la arena (campo abierto) en donde se llevó a cabo la prueba. Cada animal fue colocado en el centro de la arena y durante 5 minutos se le permitió que la explorara libremente.

Al día siguiente a la misma hora en que realizó la habituación, se comienza con la fase de familiarización, en esta fase se le presenta al animal de experimentación dos objetos de igual tamaño, volumen y forma; se les permite explorarlos libremente por 5 minutos. Al finalizar cada ensayo y antes de colocar un nuevo animal la arena y los objetos fueron limpiados con una solución de etanol al 75% para evitar pistas de olor o algún tipo de guía.

Dos horas después de la fase de familiarización se llevó a cabo la fase de reconocimiento, en la cual uno de los objetos previamente presentados a los animales de experimentación fue cambiado por otro de igual tamaño y volumen pero de diferente forma y al igual que en la fase de familiarización los animales tuvieron 5 minutos para explorar libremente ambos objetos.

El parámetro medido en esta prueba fue el índice de discriminación (ID), cuyo resultado puede variar de -1 y 1, donde una puntuación positiva indica más tiempo explorando el objeto novedoso, una puntuación negativa indica más tiempo explorando el objeto familiar y una puntuación de cero indica una preferencia nula, la fórmula utilizada para este parámetro fue la siguiente:

$$ID = \frac{(TN - TF)}{(TN + TF)}$$

TN= Tiempo con el objeto novedoso

TF= Tiempo con el objeto familiar

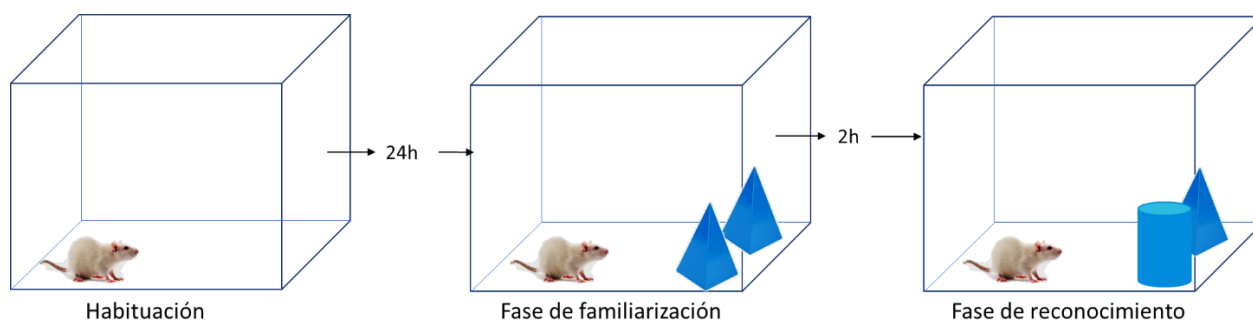


Figura 8. Procedimiento esquematizado de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON). En el esquema se ejemplifica las tres fases que comprendieron la prueba y los tiempos a los cuales se realizaron dichas fases.

5.7. Determinación de marcadores bioquímicos en sangre

Para la determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos, se realizó una toma de sangre ocular una semana antes de terminar la fase de inducción a obesidad y una semana previa al concluir el tratamiento con los alimentos funcionales en cada uno de los diferentes grupos experimentales. Las tomas fueron realizadas con un ayuno de 8 horas. Para la extracción de sangre ocular, tras anestesiarse a los animales con isoflurano, se les introdujo un tubo capilar con heparina por el ángulo medial del ojo a través de la membrana nictitante en dirección ventro-medio-caudal. Una vez dentro del seno venoso, la sangre se recolectó en un tubo seco para su posterior centrifugación. Los sueros fueron almacenados en tubos eppendorf a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Las mediciones de los diferentes marcadores bioquímicos que fueron medidos utilizando un equipo automatizado de COBAS 111 de la marca Roche, para lo cual fueron introducidos $200\text{ }\mu\text{L}$ de suero para cuantificar glucosa, colesterol y triglicéridos.

5.8. Eutanasia y manejo de los tejidos

La eutanasia de los animales de experimentación se realizó a los 7 meses de comenzada la administración de una dieta alta en grasa (DAG) o la dieta control (AIN-93), todos los grupos fueron sacrificados por decapitación con guillotina.

Después de la decapitación de los animales fue extraído el cerebro y dividido en cuatro porciones:

Hemisferio derecho: del quiasma óptico a los bulbos olfatorios y del quiasma óptico al cerebelo.

Hemisferio izquierdo: del quiasma óptico a los bulbos olfatorios y del quiasma óptico al cerebelo.

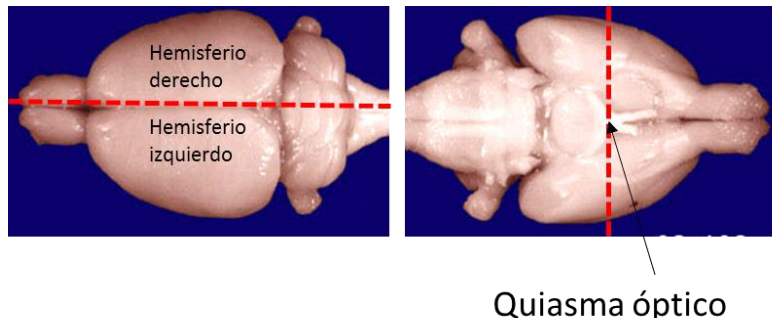


Figura 9. Esquema representativo de la división de los cerebros de los sujetos de experimentación.

El hemisferio derecho se utilizó en el presente trabajo, tanto para inmunofluorescencia como para el marcaje de espinas dendríticas. Fue post-fijado en paraformaldehído al 4% por 4 horas y después cambiado a buffer de fosfatos (PBS 1x pH= 7.4) para el marcaje de espinas dendríticas, para las inmunofluorescencias, el tejido fue post-fijado en paraformaldehído por 48 horas y cambiado a buffer de fosfatos (PBS 1x pH= 7.4) hasta su uso.

5.9. Marcaje diolístico de espinas dendríticas

Se realizaron cortes coronales de 80 micras con un vibratomo (LEICA VT1000 S). Las rebanadas fueron disparadas con balas de tungsteno cubiertas con (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('DiI'; DiI18(3) (DIL) (Invitrogen, Cat. Num. D282 DiI) siguiendo la siguiente metodología:

- Preparación del tubo:

Se cortaron aproximadamente 70 cm de tubo Tfel (INDEX Health & Science), el cual fue secado con un flujo de nitrógeno grado industrial durante dos minutos, posteriormente fue lentamente llenado para evitar la formación de burbujas con una solución de polivinilpirrolidona 0.5mg/mL (Bio-Rad), dos minutos posteriores a su llenado se retiró dicha solución y el tubo se dejó secar durante 10 minutos con nitrógeno.

- Preparación de DiL:

Se pesaron 5 mg de DiL (Invitrogen, Cat. Num. D282) en un eppendorf de 1.5 ml y fue disuelto en 334 μ L de cloruro de metileno (Sigma, Cat # 17-3). Posteriormente se pesaron 167 mg de tungsteno (Bio-Rad Cat. Num. 165-2268)

y se colocó sobre una base de vidrio limpia, donde se mezcló con la solución de Dil-cloruro de metileno. La mezcla se dejó evaporar y las partículas se recolectaron en papel parafilm. Finalmente las partículas se diluyeron en 10 mL de agua MiliQ y se sonicaron durante 40 minutos.

- Preparación de las balas:

Con una jeringa se llenó el tubo de Tfel con la solución previamente preparada de Dil-Tugsteno- Agua milli Q, evitando la formación de burbujas. Se insertó el tubo en la estación de preparación (Bio-Rad) por 15 minutos con rotación constante, al finalizar el tiempo la solución fue retirada del tubo el cual fue secado con un flujo de nitrógeno por 20 minutos. Finalmente el tubo fue contado en fracciones de 13 mm, las cuales fueron protegidas de la luz y almacenadas a 4°C con un desecante.

- Liberación de partículas:

Se llenó el cartucho con las balas y se montó en la pistola Helios-Gene Gun (Bio-Rad). Se colocó un filtro de 3 μm tamaño de poro para evitar que agregados mayores a esa medida pasaran y dañaran el tejido. Las rebanadas a utilizar fueron de 80 μm de grosor las cuales estaban colocadas en cajas para cultivo de 6 pozos con PBS 1x. Posteriormente se conectó la pistola con el gas Helio (99.99% pureza), se retiró el PBS de las rebanadas y bajo una presión de 110 psi se disparó dos veces sobre ellas a una distancia de 2.5-3 cm de la muestra. Éstas se dejaron reposar en PBS durante 12 horas y finalmente fueron montadas en portaobjetos utilizando glicerol ultra-puro como medio de montaje (Invitrogen Cat. No. 15514-011).

- Análisis de las espinas dendríticas

Se tomaron imágenes de un tamaño de 1024 pixeles por 1024 pixeles con un microscopio de laser confocal (TC-SP8, Laboratorios Centrales, CINVESTAV) utilizando un objetivo de 100 X/Oil bajo los siguientes parámetros:

Zoom: 2

Gain: 561-624

Speed: 400 Hz

Line average: 4

Laser intensity: 10%

Para el conteo de espinas, se seleccionó la segunda ramificación de la dendrita, con una longitud de entre 15 y 20 μm . Se analizaron tres dendritas de la corteza medial prefrontal (mPFC) en cuatro secciones por animal a través del software NeuronStudio (NIH, Free Software). Solo las dendritas con una alta resolución señal/fondo y sin fragmentación fueron analizadas. La clasificación de espinas tipo

hongo (mushroom), delgadas (thin) y regordetas (stubby), se realizó bajo los 3 criterios indicados por NeuronStudio (NIH, Free Software):

a) Radio del cuello (Neck ratio): 1.100 μm → Espinas con un valor mayor son clasificadas como delgadas u hongo.

b) Radio delgado (Thin ratio): 2.500 μm → Espinas con un "Radio del cuello" menor a 1 y un "Radio delgado" mayor a 2.5, son consideradas espinas tipo delgadas, de lo contrario son clasificadas como regordetas ("Radio del cuello" menor 1 y "Radio delgado" menor a 2.5).

c) Tamaño de la cabeza hongo (Mushroom size): 0.350 μm → Espinas con "Radio del cuello" igual o mayor a 1 y con un diámetro de cabeza igual o mayor a 0.35 μm , son clasificadas como espinas tipo hongo de lo contrario son consideradas regordetas.

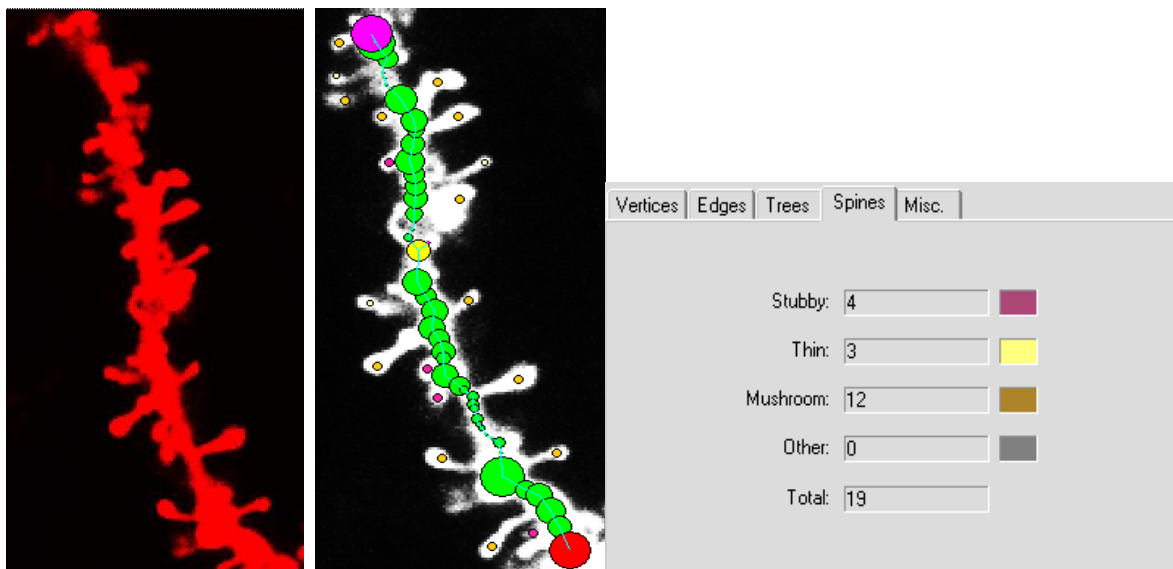


Figura 10. Imágenes representativas de las imágenes tomadas para el análisis de espinas dendríticas. Una vez obtenidas las imágenes en el microscopio confocal estas fueron exportadas como formato Tiff para poder ser compatible con el software NeuronStudio.

5.10. Medición del contenido de SIRT1 en microglia y astrocitos

La medición de SIRT1 en microglia y astrocitos se realizó en los núcleos de estas células, para lo cual se utilizó el software Imaje J.

Primero, se obtuvieron imágenes de estos dos tipos celulares en la corteza prefrontal medial de los diferentes grupos experimentales con la ayuda de un

microscopio confocal (TC-SP8, Laboratorios Centrales, CINVESTAV) utilizando un objetivo de 40 X,

Con ayuda del software del microscopio SP8- Leica se obtuvieron snapshot de cada uno de los canales que se utilizaron (azul-Dapi, verde- Alexa 488 y rojo-Cy5) y se exportaron como imágenes jpeg.

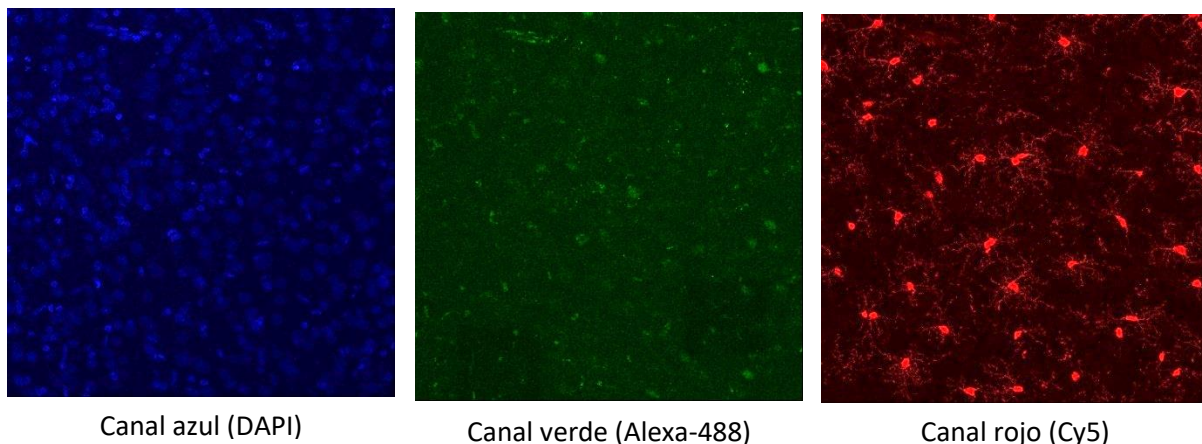


Figura 11. Imágenes Ilustrativas de los canales utilizados para la medición de SIRT1

Posteriormente ya en el software Image J se importaron dichas imágenes y se quitó todo el fondo posible, después con la herramienta “merge channels” realizamos la combinación de las tres imágenes que teníamos para obtener la imagen final en la que se midió el contenido de SIRT1.

Esa imagen compuesta que se obtuvo en el punto anterior tiene que ser guardada con formato jpeg para su posterior utilización.

Para la medición de SIRT1 se abre la imagen que se acaba de construir, con la ayuda de las diferentes herramientas se delineó el contorno de cada núcleo de cada célula presente en la imagen, para posteriormente medir la intensidad para cada canal gracias a la herramienta RGB measure.

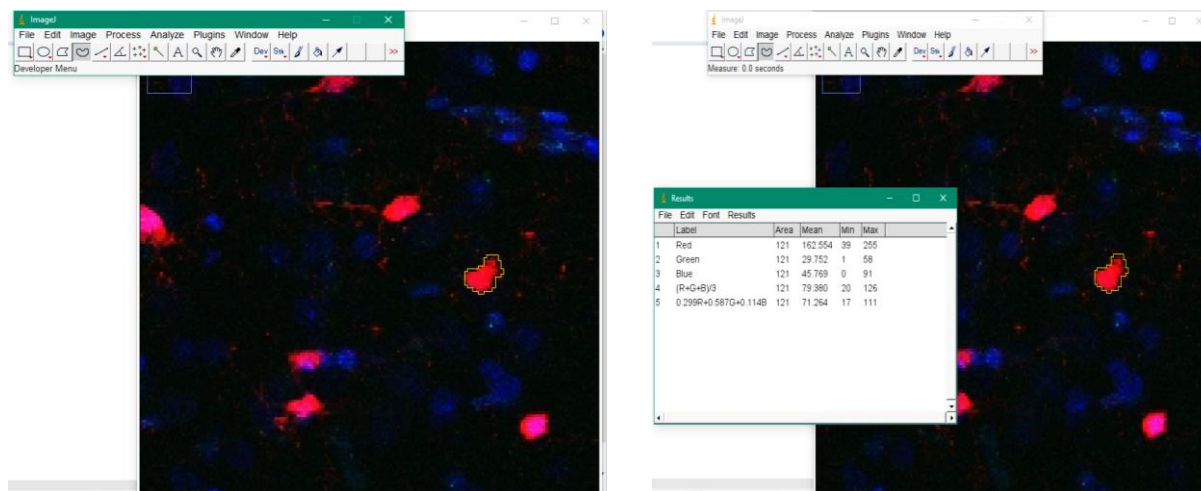


Figura 12. Imágenes ilustrativas de cómo se realizó la cuantificación de SIRT1.

5.11. Inmunofluorescencia

En el presente proyecto se realizaron dobles marcajes cuyas combinaciones se mencionan a continuación:

- SIRT1 (Cell Signaling, 1:250) + GFAP (Millipore, 1:500).
- SIRT1 (Cell Signaling, 1:250) + Iba-1 (Wako, 1:500)

Para lo cual se utilizaron cortes coronales de 40 micras de grosor obtenidas con un micrótopo de deslizamiento (Leica RM 2235), las cuales fueron almacenadas con crio-protector hasta su uso.

Un día antes de iniciar la inmunofluorescencia, se escogieron las rebanadas a utilizar y se lavaron 6 veces con PBS 1x (pH 7.4, Gibco) y se dejaron reposar toda la noche en PBS 1x a 4°C. Al día siguiente se inició con la inmunofluorescencia y las rebanadas fueron lavadas una vez por diez minutos con PBS 1x, posteriormente se permeabilizó la membrana con PBS 1x-triton al 0.3% (tritón X-100, Affy metrix, 9002-93-1) durante 20 minutos, una vez transcurrido ese tiempo, las rebanadas fueron lavadas tres veces con PBS-triton al 0.3% por 10 minutos.

Posteriormente se bloquearon las uniones inespecíficas con contenido suero de caballo al 5% (Vector Laboratories, 94010) durante 5 minutos, después se dieron tres lavados con PBS-triton 0.3% durante 10 minutos.

Al finalizar este tiempo, se procedió a incubar durante 48 horas con los anticuerpos primarios antes mencionados, en una solución que contenía suero de caballo al 5% (Vector Laboratories, 94010) y PBS-triton al 0.3%. Una vez transcurrido ese tiempo, las rebanadas fueron lavadas 3 veces con PBS-triton al 0.3% durante 10 minutos para proceder a la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

| Anticuerpos primarios | Anticuerpos secundarios | Concentración |
|-----------------------|--|---------------|
| SIRT1 + GFAP | SIRT1 → Alexa 488 anti-mouse (Jackson InmunoR) | 1:500 |
| | GFAP → Cy5 anti-rabbit (Jackson InmunoR) | 1:500 |
| SIRT1 + Iba-1 | SIRT1 → Alexa 488 anti-mouse (Jackson InmunoR) | 1:500 |
| | Iba-1 → Cy5 anti-rabbit (Jackson InmunoR) | 1:500 |

Tabla 2. Combinación de anticuerpos primarios y secundarios.

Después las rebanadas fueron lavadas con PBS-triton al 0.3% 3 veces por 10 minutos, al finalizar los lavados fueron incubadas con DAPI durante 10 minutos y lavadas después con PBS-triton al 0.3% 3 veces por 10 minutos, para finalmente ser montadas en portaobjetos usando VectaShield (Vector Laboratories, 1000) como medio de montaje.

Para el análisis de estas laminillas se obtuvieron imágenes de un tamaño de 387.50µm por 387.50µm con un microscopio de laser confocal (TC-SP8, Laboratorios Centrales, Cinvestav) utilizando un objetivo de 40 X bajo los siguientes parámetros:

Zoom: 0.75

Speed: 600 Hz

Gain: 700 - 770

Line average: 3

Laser intensity: blue channel 5%, red channel 10% and green channel 15%

Una vez obtenidas las imágenes se realizó un “snapshot” de la proyección máxima de las imágenes y se exportaron en formato JPEG para que fuesen compatibles con el programa Imaje J (NIH, Freeware software) el cual se utilizó para su análisis. Una vez abiertas las imágenes en formato JPEG con el programa Imaje J, se seleccionó en el menú imagen, se ajustó el brillo y la ganancia, esto en el menú “image”, posteriormente en el menú “plugins” se seleccionó la opción “Analyze” y finalmente la opción “cell counter” se dio clic en “Initialize” y se seleccionó el tipo de célula a contar y se fueron marcando las células que presentaban la marca deseada.

5.12. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad versión 6.01, se realizó la comparación de grupos múltiples mediante el análisis de varianzas (ANOVA de una y dos vías) seguido de la prueba estadística de Tuckey. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

6. Resultados

6.1. Efecto de la administración de una dieta alta en grasa sobre los parámetros metabólicos en ratas adultas Wistar.

Después de administrar durante cuatro meses a los animales de experimentación con una dieta alta en grasa, se midieron los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en muestras de plasma que se obtuvo por vía retro-ocular tras ocho horas de ayuno (Fig. 13), esto en colaboración con la Mtra. Mónica Sánchez del Instituto Nacional para la Nutrición Salvador Zubirán (INNNSZ). Se observaron alteraciones significativas en el grupo DAG + 5%S en los niveles de glucosa 99.70 mg/dL ($*p > 0.05$), triglicéridos 165.4 mg/dL ($***p < 0.001$) y colesterol 117.8 ($**p < 0.01$) en comparación con las ratas control (Tabla 1).

Tabla 3. Resultados de las determinaciones bioquímicas a los cuatro meses de administración de HFD. Los resultados se expresan como la media más menos el error estándar. Mann-Witney test *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

| GRUPO | PESO (g) | GLUCOSA mg/dL | TRIGLICERIDOS mg/dL | COLESTEROL mg/dL |
|---------|------------------|---------------|---------------------|------------------|
| CONTROL | 447.04 ± 0.78 | 84.98 ± 7.1 | 107.1 ± 1.3 | 92.99 ± 4.2 |
| HFD | 539.61 ± 1.74 ** | 99.70 ± 3.5 * | 165.4 ± 4.5*** | 117.8 ± 4.5** |

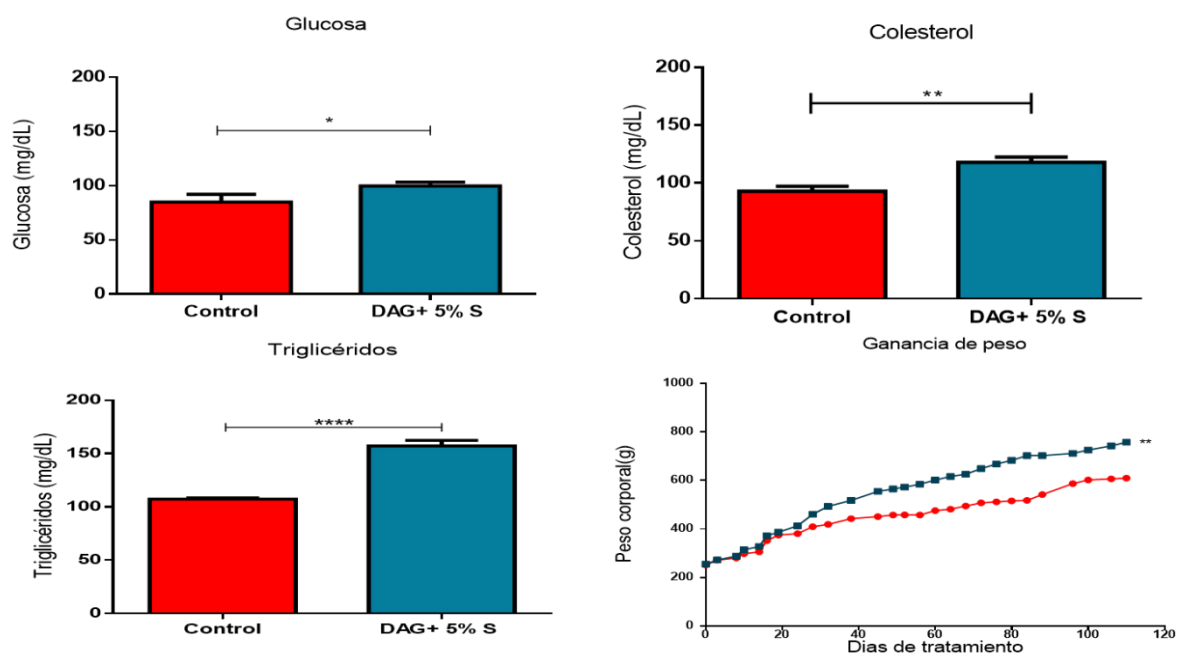


Figura 13. Graficas de glucosa, triglicéridos, colesterol y ganancia de peso en animales con cuatro meses de consumo de DAG + 5% S. Los datos fueron analizados con Mann-Witney test *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.

6.2. Alteraciones cognitivas tempranas causados por la ingesta de dieta alta en grasa en ratas Wistar adultas.

Al finalizar los análisis bioquímicos se realizaron dos pruebas cognitivas con el fin de determinar el efecto de la dieta alta en grasa sobre la función cognitivas dependientes del hipocampo y la corteza prefrontal. En la figura 14 A se muestran el porcentaje de alternación espontanea en la prueba del laberinto en forma de T. Se puede observar que los sujetos que consumieron DAG + 5%S (44.03 %) durante cuatro meses presentan un menor porcentaje de alternación en comparación con el grupo control (69.03 %).

En cuanto a la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON), los animales con DAG + 5%S exploraron el objeto novedoso durante menos tiempo (41.61%) en comparación con las ratas control (69.03 %) (*p<0.05), lo que indica una alteración a nivel cognitivo. En la figura 14 B se observa que el grupo con DAG + 5%S pasa

un mayor tiempo con el objeto familiar ya que muestra un índice de reconocimiento negativo.

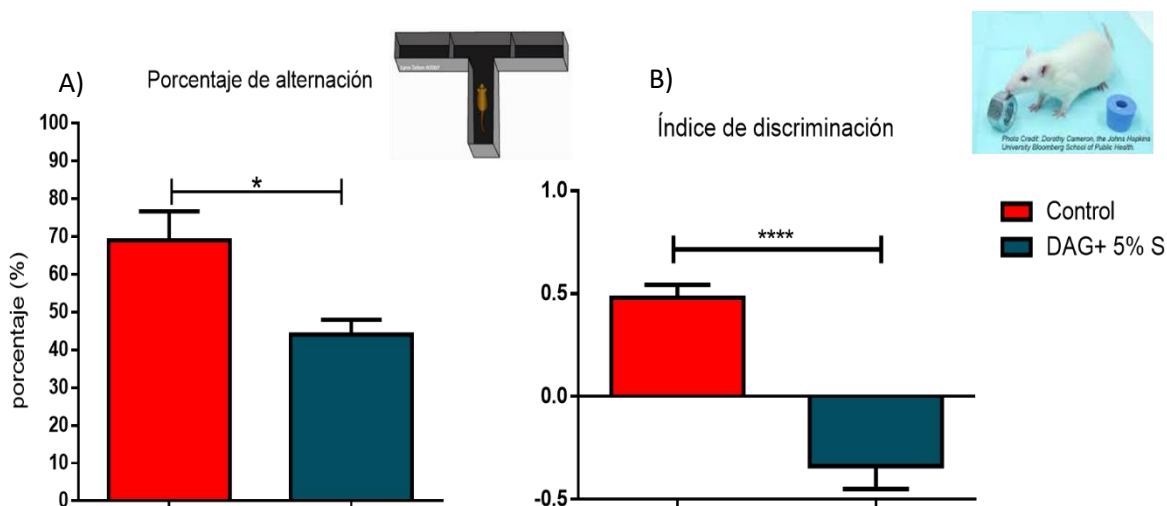


Figura 14. Porcentaje de alternación y reconocimiento de objeto novedoso a los cuatro meses de dieta DAG. A) *Porcentaje de alternancia a los cuatro meses de la administración de DAG. Los resultados que se muestran se obtuvieron del promedio de seis ensayos, tres por día durante dos días. Las ratas obesas muestran una menor alternación en comparación con las ratas control (* $p > 0.05$). B) Índice de discriminación en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. T de Student no-pareada. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.*

6.3. Efecto de una combinación de alimentos funcionales sobre alteraciones bioquímicas en ratas adultas con obesidad.

Una vez que los animales mostraron daño cognitivo y alteraciones metabólicas (a los cuatro meses de ingesta de DAG + 5% S) se inició el tratamiento con la combinación alimentos funcionales (CAF) durante tres meses. Al finalizar este periodo se midieron los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol total.

6.3.1. Niveles de glucosa en sangre

Se observó que el grupo DAG + 5% S presenta concentraciones altas glucosa (178.98 mg/dL) en comparación con el grupo control (115.27 mg/dL), mientras que la adición de CAF en el grupo DAG + 5% S + CAF logra restablecer sus valores a los niveles control (125.25 mg/dL) así mismo se midieron los niveles de glucosa de los animales que después de cuatro meses con DAG regresaron a dieta control (AIN-93), así como a los animales que regresaron a dieta control más la suplementación con CAF. Estos dos grupos muestran diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa en comparación con el grupo DAG + 5% S (AIN-93 + 5%S, 127.11 mg/dL y AIN-93 + 5% S + CAF, 123.03), pero los valores son muy similares al control (Fig. 15A).

6.3.2. Niveles de triglicéridos en sangre

En la figura 15 B se muestran los niveles de triglicéridos de los diferentes grupos experimentales, en donde se puede observar que los animales obesos que consumieron la CAF reducen de manera significativa el nivel de triglicéridos en plasma (DAG + 5% S + CAF, 81.40 mg/dL), mientras que el grupo DAG + 5% S aún presenta niveles altos de triglicéridos en comparación al grupo control (157.48 mg/dL). Por otro lado, los grupos AIN-93 + 5%S (156.00 mg/dL) y AIN-93 + 5% S + CAF (124.10 mg/dL) no presentan diferencia ni con el grupo control ni con los grupos DAG + 5% S y DAG + 5% S + CAF.

6.3.3. Niveles de colesterol en sangre

En la figura 15 C se muestran los niveles de colesterol, en donde podemos observar que tanto el grupo DAG + 5%S (154.8 mg/dL, * $p < 0.05$ vs Control) y AIN-93 + 5%S (131.83 mg/dL, * $p < 0.05$ vs Control) presentan los niveles más altos de colesterol, esto al ser comparados con el grupo Control (89.81 mg/dL), mientras que los grupos experimentales que consumieron la combinación de alimentos funcionales presentan niveles cercanos a los del control; DAG + 5%S + CAF (74.67 mg/dL) y AIN + 5%S + CAF (94.89 mg/dL) respectivamente.

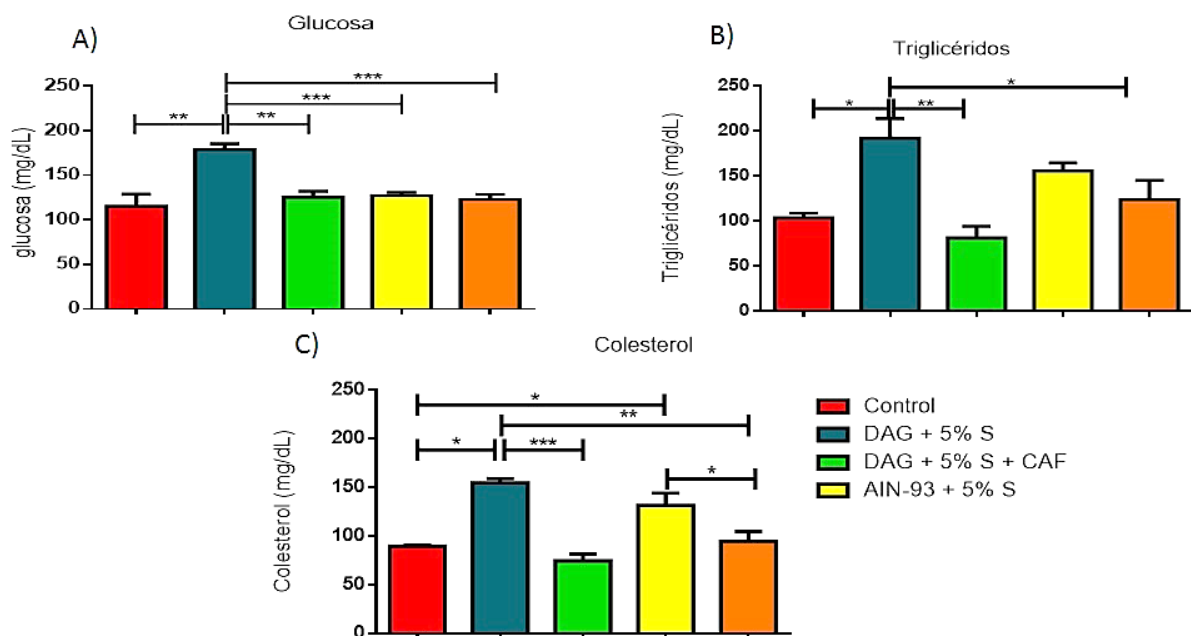


Figura 15. Niveles de glucosa y triglicéridos en plasma de ratas obesas. A) Niveles de Glucosa y 2 A) Niveles de Triglicéridos, las mediciones se realizaron en plasma mediante el método automatizado de COBAS. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía con un post-test Bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6.3.4. Peso corporal e ingesta de alimento

Aunado a la mediciones bioquímicas que se realizaron al finalizar el tratamiento, también se realizó el monitoreo del peso corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales así como de la ingesta de alimento.

En la figura 16 A y 16 A' se muestra la gráfica del seguimiento de peso de los diferentes grupos experimentales, en donde se observa que el grupo DAG + 5% S tuvo un aumento considerable de peso a través de todo el tiempo que duro el experimento, mientras que tanto los animales obesos, como los que regresaron a dieta AIN-93 y que recibieron la combinación de alimentos funcionales (CAF) presentan una disminución de peso comparable al peso que presenta el grupo control.

En la figura 16 B se muestra la ingesta calórica que tenían los diferentes grupos experimentales y 16 B' se muestra el consumo en gramos de alimentos que tuvieron los diferentes grupos experimentales durante todo el experimento.

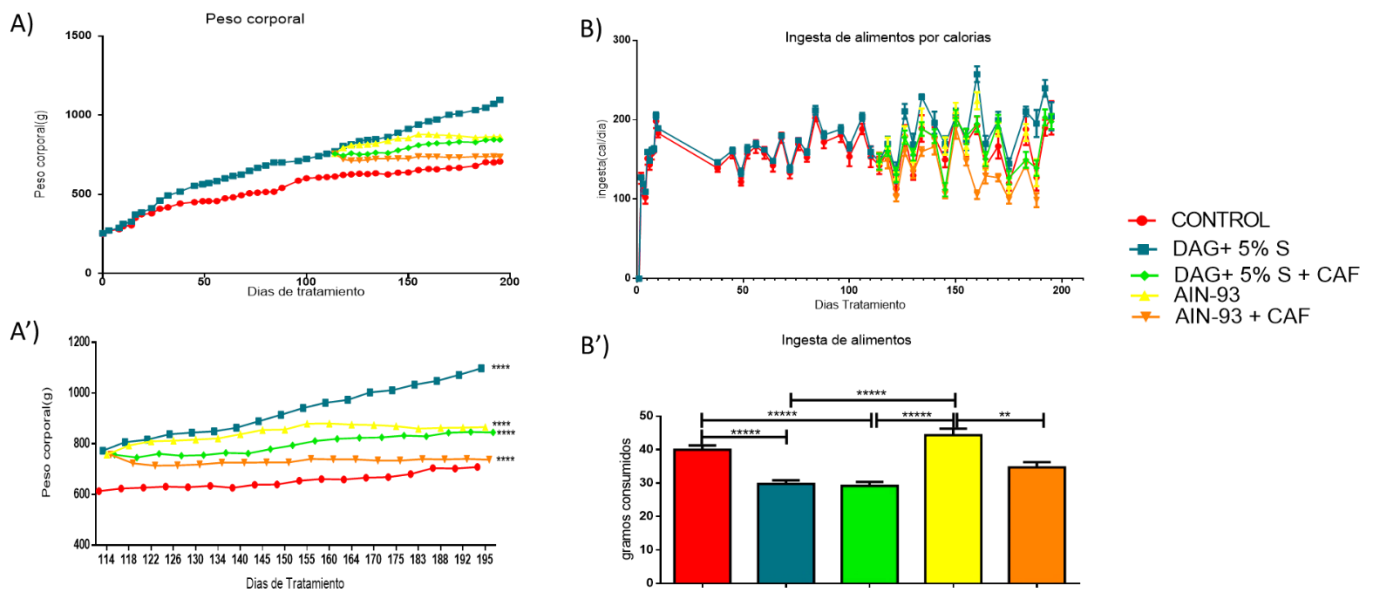


Figura 16. Gráficas de peso corporal e ingesta de comida durante los 7 meses de tratamiento. En la figura 16 A se muestra el peso corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales durante todo el experimento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con un post-test Dunnett $****p < 0.0001$ todos los grupos se compararon contra el control. En la figura 16 B se muestra ingesta de alimento, expresado en calorías/día de los animales de los diferentes grupos experimentales durante todo el experimento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con un post-test Dunnett $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$

6.4. Efecto de una combinación de alimentos funcionales sobre las alteraciones cognitivas en ratas obesas

Al finalizar los 7 meses de tratamiento se llevaron a cabo las mismas pruebas conductuales realizadas en la primera fase, la prueba en el laberinto en forma de T y el reconocimiento de objeto novedoso, obteniendo los siguientes resultados.

6.4.1. Alternación espontánea

En la figura 17 A se muestra el porcentaje de alternación después de siete meses de administración de DAG más tres meses con la combinación de alimentos funcionales. Como se observa, el grupo DAG + 5% S (38.3 %, $***p < 0.001$) presenta un porcentaje menor de alternancia en comparación al grupo control (82.65 %), de igual forma el grupo AIN-93 +5% S presenta un porcentaje menor de alternancia en comparación con los animales control (36.10 %, $***p < 0.001$). En cambio los grupos que recibieron los alimentos funcionales mejoraron en esta prueba ya que no presentan diferencias estadísticamente significativas al ser comparados con el grupo Control (DAG + 5%S + CAF 69.41% y AIN-93 + 5%S + CAF, 64.28 %).

6.4.2. Reconocimiento de objeto novedoso

En cuanto a la prueba del RON, se cuantificó el índice de discriminación entre un objeto familiar y uno novedoso. Se observa que el grupo DAG+ 5% S presenta un índice de discriminación de -0.21, lo que quiere decir que los animales de este grupo no discriminan entre el objeto novedoso y el familiar, mientras que los animales que consumieron la combinación de alimentos funcionales presentan valores positivos y cercanos a 1, lo que indica que lograron discriminar correctamente entre el objeto nuevo y el familiar (Fig. 17 B).

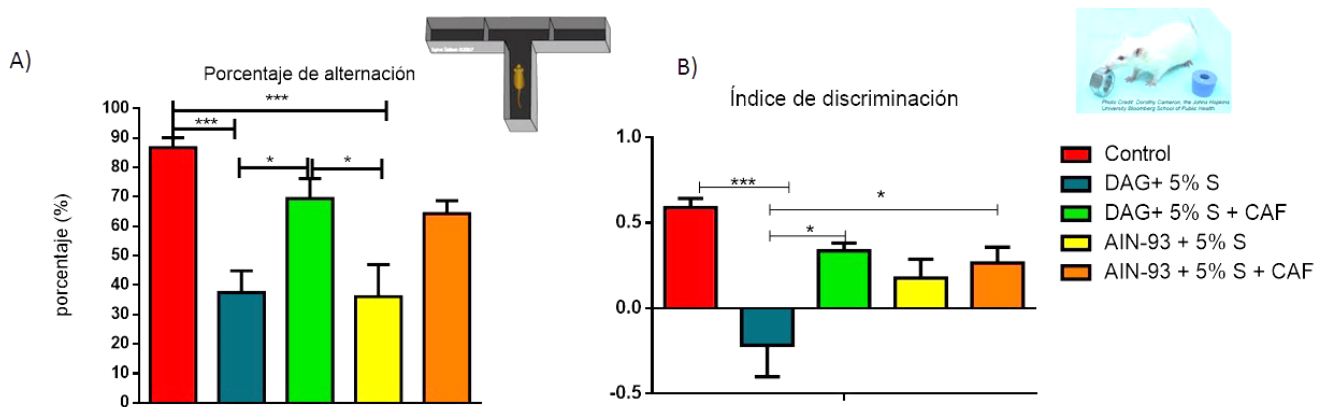


Figura 17. Porcentaje de alternación y reconocimiento de objeto novedoso después de un tratamiento con una CAF en ratas obesas. A) Porcentaje de alternaciones en ratas obesas y control tratadas con una CAF. ANOVA de una vía con un post-test Bonferroni $*p < 0.05$ $**p < 0.01$. B) Índice de discriminación de los diferentes grupos experimentales. ANOVA de una vía y un post test Bonferroni ($*p > 0.05$, $**p > 0.01$ y $***p > 0.001$).

6.5. Efecto de la administración de una combinación de alimentos funcionales sobre el número de espinas dendríticas en corteza prefrontal medial de ratas obesas.

Para conocer el efecto de la combinación de alimentos funcionales (CAF) sobre el número de espinas dendríticas en la corteza prefrontal, se utilizó la técnica del

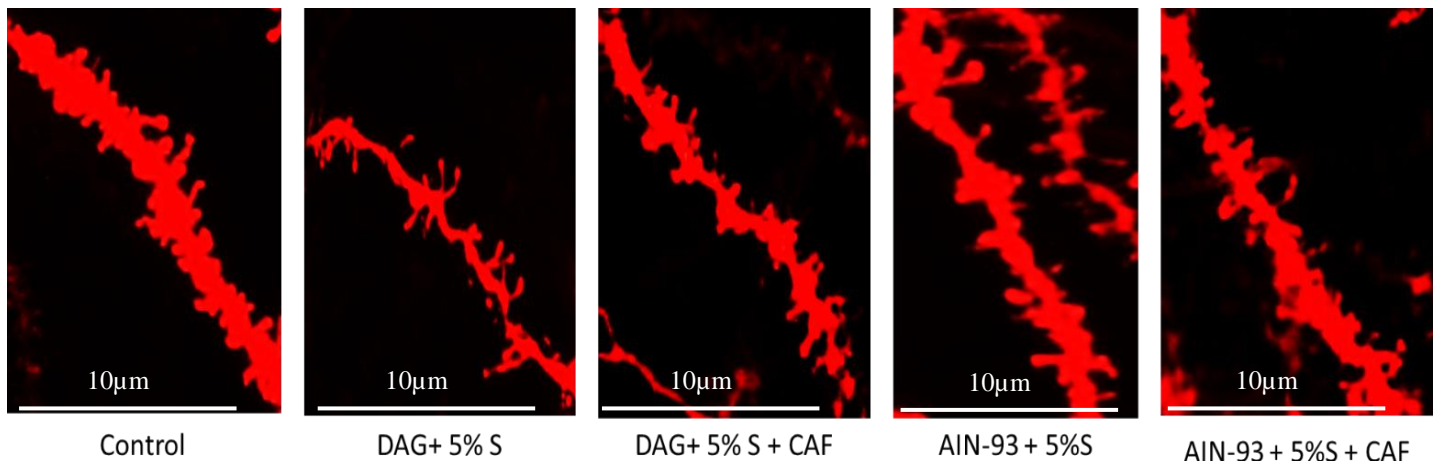
marcaje diolístico pudiendo así contabilizar el número y el tipo de espinas dendríticas de una manera confiable y con alta resolución (Fig. 18 A).

Los datos se analizaron de dos maneras: el número total de espinas dendríticas por cada grupo, y la clasificación del tipo de espinas dendríticas de cada grupo (hongo, delgadas, regordetas).

Como se puede observar en la figura 18 B, el grupo de DAG + 5% S (23 espinas dendríticas) muestra una disminución en el número de espinas dendríticas al ser comparado con el grupo control (promedio de espinas/ μm : 23 y 42, respectivamente), mientras que la adición del CAF aumento este número ya que el grupo DAG+ 5%S + CAF (promedio de espinas/ μm : 45) y AIN-93 + 5%S + CAF (promedio de espinas/ μm :48) mostraron valores similares al control. Sin embargo el grupo DAG + 5%S es comparado con el grupo AIN-93 + 5%S no muestra una diferencia estadísticamente significativa, pero se logra observar una tendencia a una recuperación (promedio de espinas/ μm : 23 y 36, respectivamente), es decir que el regreso a una dieta equilibrada ayuda disminuir los efectos de una la ingesta de grasas y azúcares. Pero el consumo de alimentos funcionales recupera en mayor medida el número de espinas dendríticas, inclusive en los animales que continuaban ingiriendo una dieta alta en grasa y azúcares.

Una vez realizada la clasificación de las espinas dendríticas (Fig. 18 C), se observa la misma tendencia que los datos anteriores: los grupos que recibieron la combinación de alimentos funcionales, mostraron incrementos en los diferentes tipos de espinas dendríticas, inclusive al ser comparados con el grupo control. Mientras que el grupo DAG + 5%S presentan una reducción principalmente en espinas tipo hongo y tipo regordetas en comparación a los demás grupos experimentales.

A)



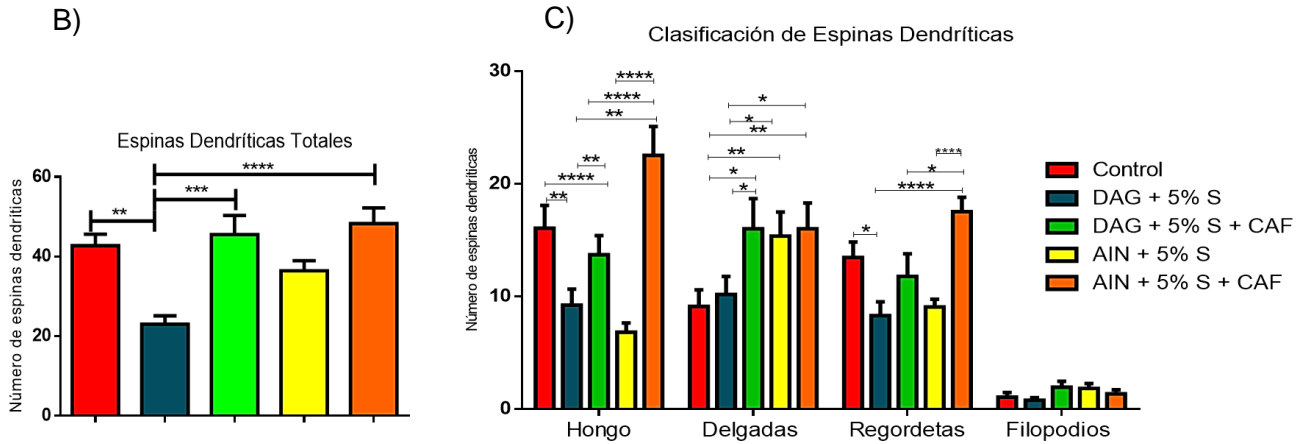


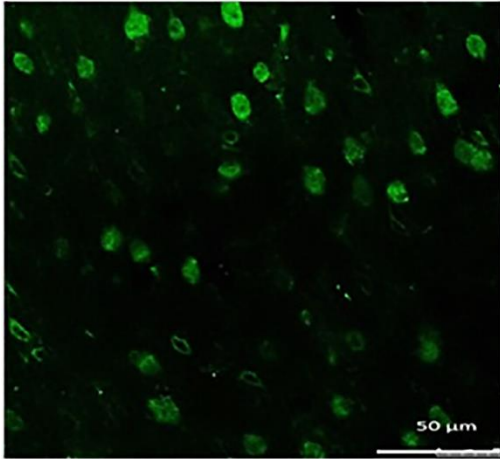
Figura 18. Número de espinas dendríticas en la corteza prefrontal medial (PFCm) de ratas obesas alimentadas con una CAF. A) Imágenes representativas del tipo de neuritas que se utilizaron para la contabilización y clasificación de las espinas dendríticas en la PFCm de ratas obesas y administradas con una CAF. Los criterios de inclusión que se utilizaron fueron: dendrita aislada, tasa alta fondo: intensidad, lo más recta posible, de segundo orden y con una longitud mínima de 20 μm . B) Se muestra el número total de espinas dendríticas en corteza pre-frontal de ratas obesas y administradas con una CAF. C) Clasificación de espinas dendríticas en corteza pre-frontal de ratas obesas y administradas con una CAF. Las columnas representan la media \pm SEM, los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías y un post test Bonferroni * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

6.6. Efecto de una combinación de alimentos funcionales sobre SIRT1 en corteza prefrontal medial de ratas obesas.

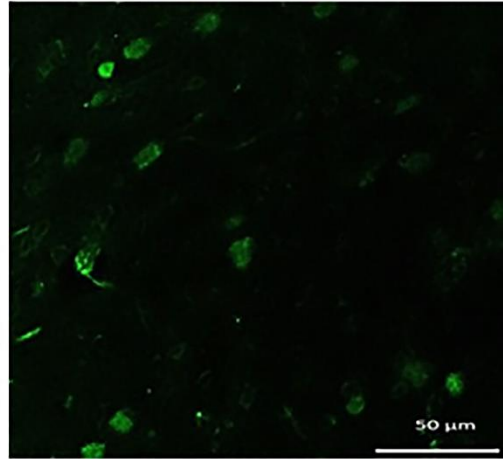
Para conocer el efecto de la combinación de alimentos funcionales sobre la presencia de SIRT1 en la corteza, se extrajo la corteza pre-frontal y se evaluó el número de células con inmunoreactividad (ir) positiva a SIRT1 en la parte infralímbica y prelímbica. Se observó que existe un menor número de células SIRT1-ir en las ratas obesas (DAG + 5% S) en comparación con las ratas control (** $p < 0.01$). Sin embargo, cuando se analizaron a los animales que consumieron los alimentos funcionales DAG + 5%S + CAF y AIN-93 + 5%S + CAF, se observó un incremento en la células inmunoreactivas a SIRT 1 en comparación a los grupos DAG + 5%S (**** $p < 0.0001$) y el grupo control (** $p < 0.01$), lo cual se puede observar en la figura 19 A y B.

A)

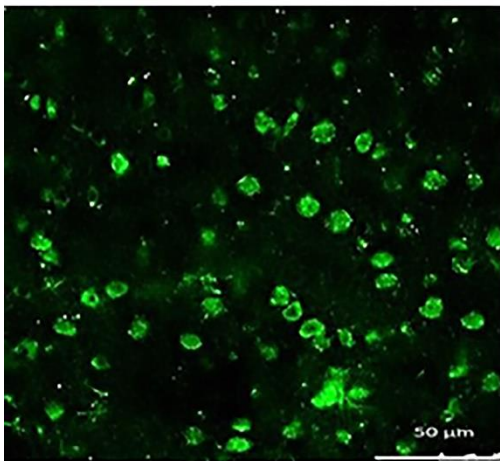
Control



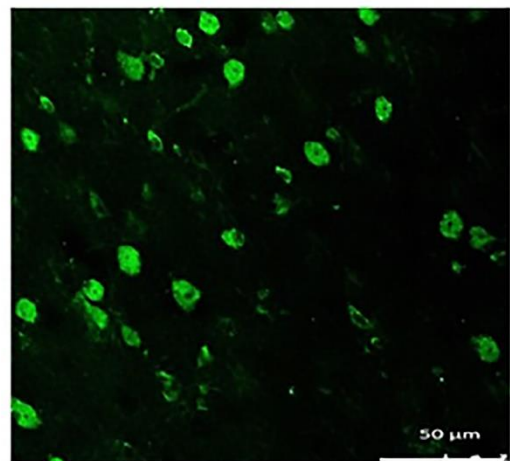
DAG + 5% S



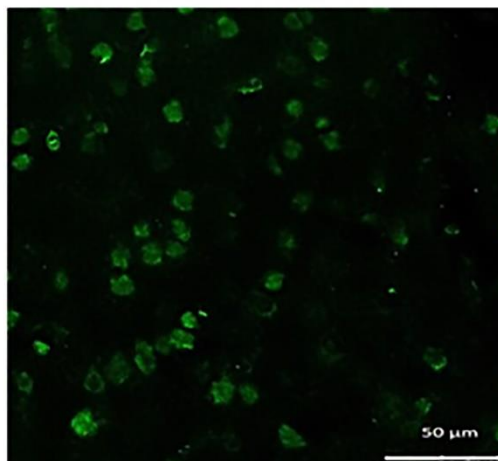
DAG + 5% S + CAF



AIN-93 + 5% S



AIN-93 + 5% S + CAF



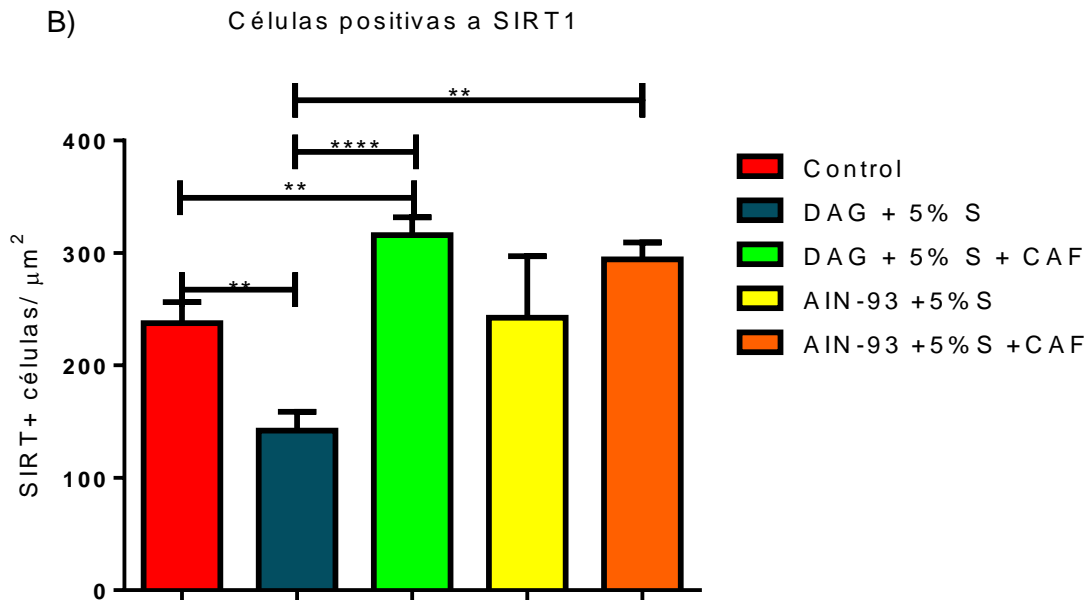


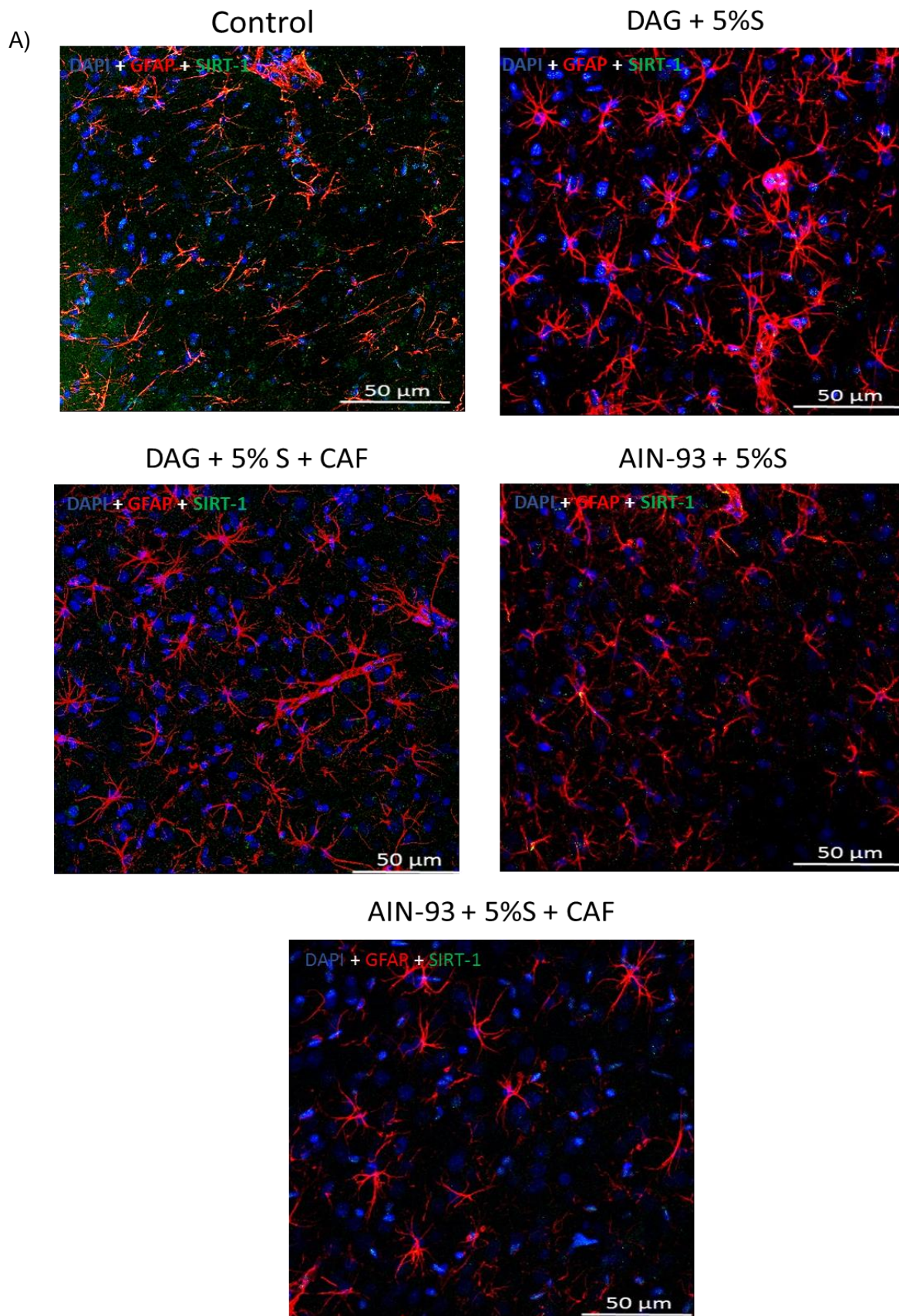
Figura 19. SIRT1 en la corteza prefrontal media (PFCm) de ratas obesas. A) se muestran imágenes representativas de la presencia de SIRT1 en corteza prefrontal medial de los diferentes grupos de experimentación después de 7 meses con DAG y tres meses con una CAF. B) Cuantificación del número de células positivas para SIRT1 en PFCm de los diferentes grupos experimentales. Las columnas representan la media más o menos el error estándar (ANOVA de una vía y un post test Bonferroni $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$).

6.7. Efecto de la combinación de alimentos funcionales sobre el número de astrocitos en la corteza prefrontal de ratas obesas

Para conocer el efecto de la combinación de los alimentos funcionales sobre el número de astrocitos en la corteza prefrontal, se contabilizó el número de astrocitos en la corteza prefrontal medial, en la figura 20 A se muestran imágenes representativas de los diferentes grupos de experimentación utilizadas para la contabilización del número de astrocitos y de la cantidad de SIRT1 en ellos.

En la figura 20 B se muestra la gráfica del número de astrocitos en los diferentes grupos de experimentación. Se observó un incremento en el número de astrocitos en los grupos DAG + 5% S (178.12 cél/mm^2 , $**p < 0.01$) y AIN-93 + 5%S (199.49 cél/mm^2 , $***p < 0.001$) en comparación con el grupo control, mientras que el grupo DAG + 5% S + CAF (128.56 cél/mm^2 , $**p < 0.01$) y AIN-93 + 5%S + CAF (153.64 cél/mm^2) muestra valores parecidos a los del control (137.56 cél/mm^2).

Además de cuantificar el número total de astrocitos, también cuantificamos el contenido de SIRT1 en sus núcleos. El contenido total de SIRT1 en los astrocitos en la CPF se muestra en la figura 20 C, donde se observa que los grupos DAG + 5%S (17.19 intensidad en píxeles) y AIN-93 + 5%S (14.53 intensidad en píxeles) presentan los niveles más bajos, mientras que el grupo DAG + 5% S + CAF (19.17 intensidad en píxeles) y el grupo AIN-93 + 5%S + CAF (25.80 intensidad en píxeles) presentan una recuperación en cuanto al contenido de SIRT1 en astrocitos.



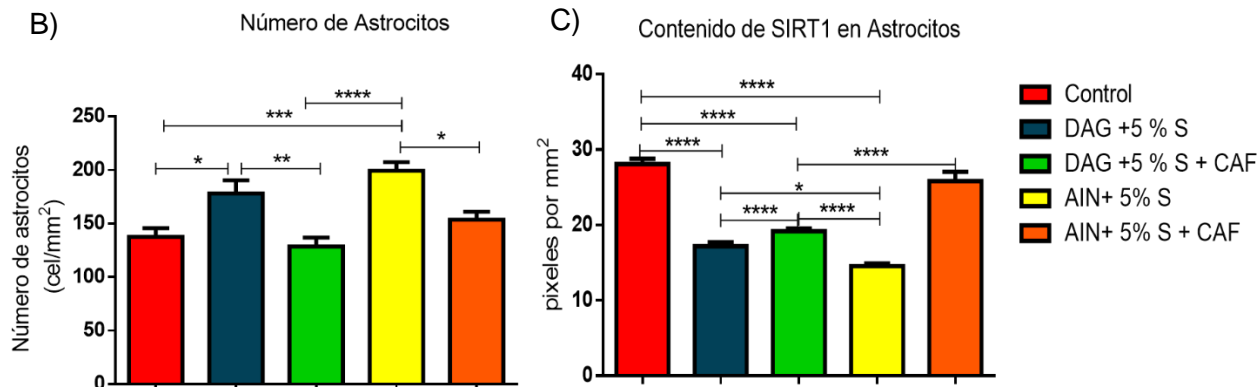


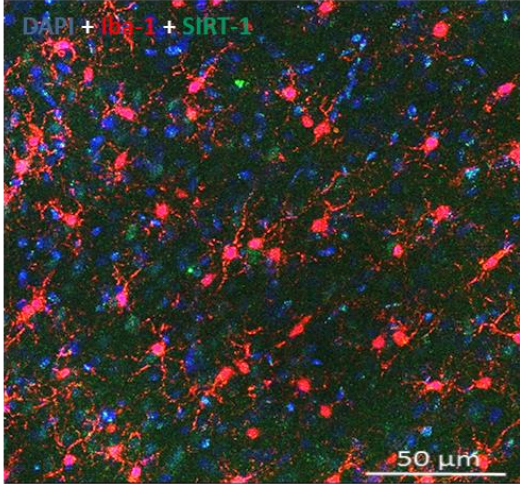
Figura 20. Número de astrocitos en la corteza prefrontal medial de ratas obesas. En A) se muestran imágenes representativas de astrocitos en corteza prefrontal medial de los diferentes grupos de experimentación después de 7 meses con DAG y tres meses con la CAF. En B) cuantificación del número de células positivas a GFAP (proteína gliofibrilar ácida, marcador de astrocitos) en la corteza prefrontal medial de los diferentes grupos de experimentación después de 7 meses con DAG y tres meses con la CAF. Las columnas representan la media más menos el error estándar (ANOVA de una vía y un post test Bonferroni $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$).

6.8. Efecto de la combinación de alimentos funcionales sobre el número de microglía en la corteza prefrontal de ratas obesas

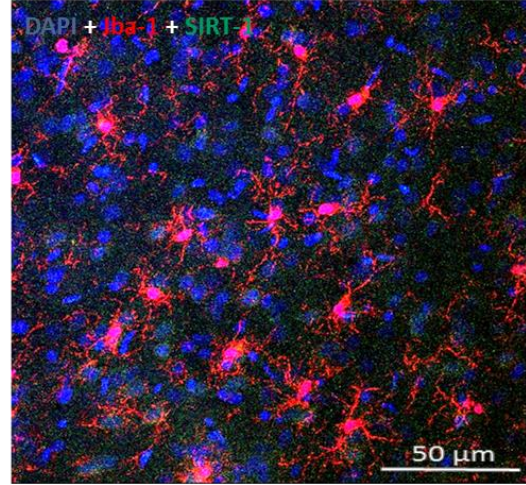
Otro punto a analizar en este proyecto fue el número de microglía, para lo cual, se extrajo la corteza prefrontal medial y se contabilizó el número de microglía. Los resultados obtenidos (Fig. 21), muestran que el grupo DAG + 5% S presenta una disminución en el número de microglía total ($118.23 \text{ células/mm}^2$, $*p < 0.05$), esto cuando se compara con el grupo Control ($152.70 \text{ células/mm}^2$) y los demás grupos experimentales (DAG + 5% S + CAF 159 células/mm^2 , AIN-93 + 5% S 198 células/mm^2 y AIN-93 + 5% S + CAF $235.47 \text{ células/mm}^2$) (Fig. 21 A). Una vez analizado el número total de microglía, decidimos cuantificar la cantidad de SIRT1 (Fig. 21 B) en sus núcleos, a través de medir la intensidad para la marca de SIRT1 con el software Image J. La cuantificación de SIRT1 en microglía nos indica que los grupos DAG + 5% S ($15.18 \text{ pixeles por mm}^2$) y AIN-93 + 5% S ($13.93 \text{ pixeles por mm}^2$) presentan una disminución en SIRT1 en comparación al grupo control ($24.27 \text{ pixeles por mm}^2$, ambos $****p < 0.0001$). Mientras que cuando se incluyen los alimentos funcionales en DAG + 5% S + CAF ($30.15 \text{ pixeles por mm}^2$) y AIN-93 + 5% S + CAF ($20.55 \text{ pixeles por mm}^2$) se observa un incremento en la reactividad para SIRT1 en comparación al grupo Control ($24.27 \text{ pixeles por mm}^2$, $****p < 0.0001$ y $*p < 0.05$, respectivamente).

A)

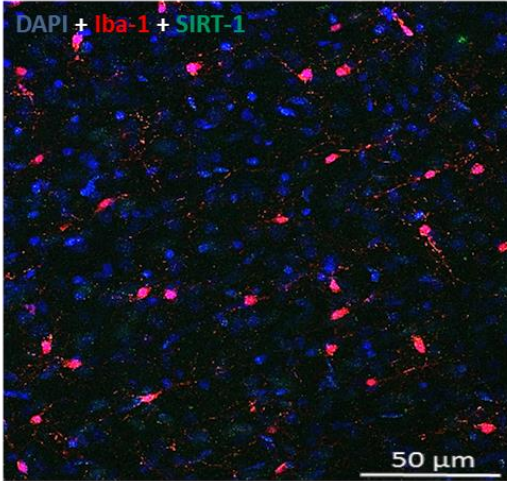
Control



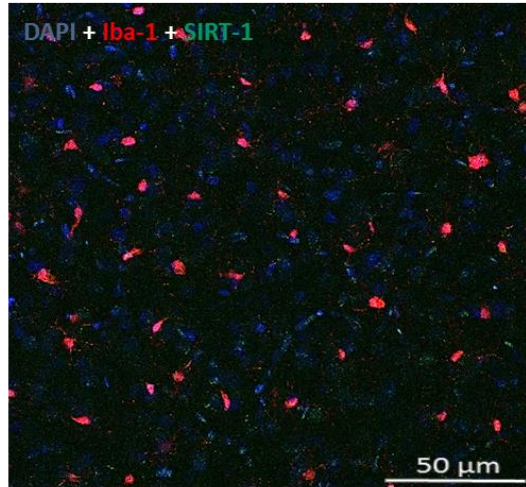
DAG + 5%S



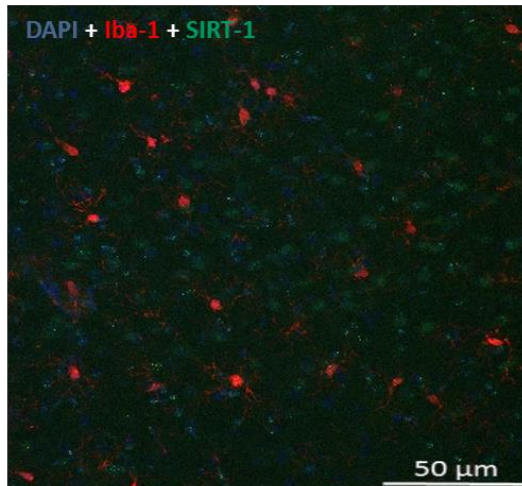
DAG + 5% S + CAF



AIN + 5% S



AIN + 5% S + CAF



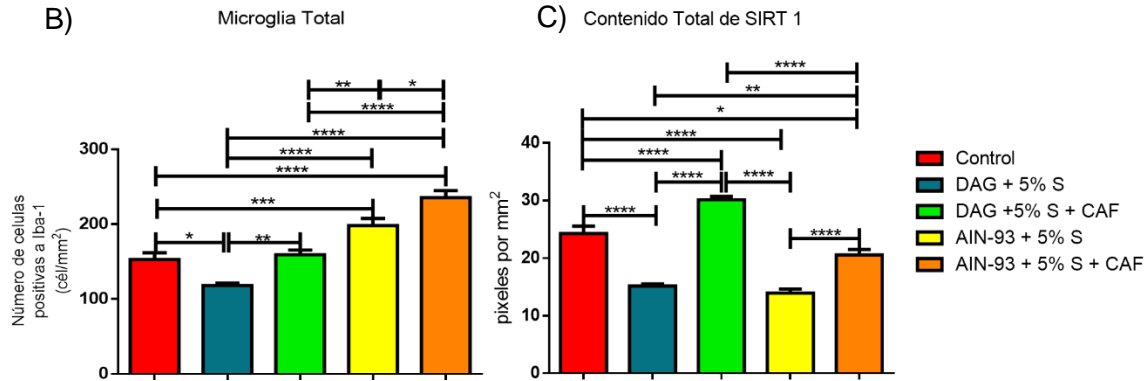


Figura 21. Cuantificación de microglia total y su contenido de SIRT1. En A) se muestran fotomicrografías representativas de inmunofluorescencia para Iba-1 de los diferentes grupos de experimentación. En B) se muestra el número total de células positivas para Iba-1 (marcador de microglia). Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía con un pos test Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. En C) se muestra el contenido de SIRT1 en las células positivas para Iba-1. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía con un pos test Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Debido a los resultados inesperados que obtuvimos en cuanto al número incremento en el número total de microglia, decidimos clasificarla en activa e inactiva según su morfología, siguiendo los parámetros utilizados por Streit et al., 2014. Una imagen representativa del tipo de morfología que se utilizó para clasificarla se observa en la Fig. 22A.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

6.8.1. Cantidad total de microglia inactiva

En cuanto a la cantidad de microglia inactiva pudimos observar que el grupo DAG + 5%S (32.30 cél/mm²) presenta un menor número de células en este estado en comparación al resto de los diferentes grupos de experimentación (**** $p < 0.0001$), mientras que el grupo DAG + 5%S + CAF (69.10 cél/mm²) no presenta diferencia estadísticamente significativa al ser comparada con el control, pero al ser comparada con el grupo DAG + 5%S vemos que existe un incremento en el número de microglia inactiva (**** $p < 0.0001$) (Fig. 22 B).

6.8.2. Cantidad de SIRT 1 en microglia inactiva

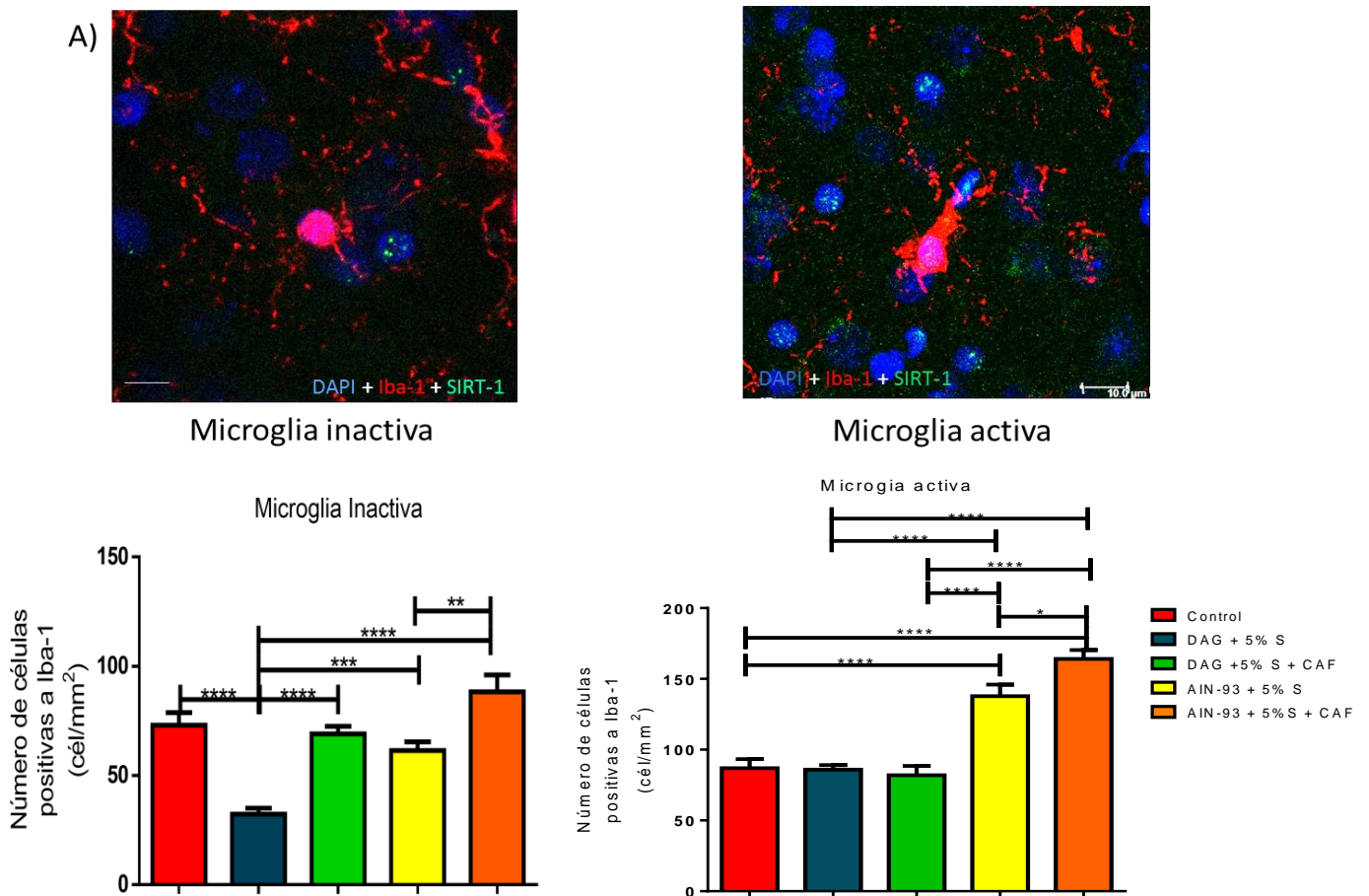
Al cuantificar la intensidad para la señal de SIRT1 (Fig. 22 D), no encontramos diferencia estadísticamente significativa entre el grupo Control (19.80 pixeles por mm²) y el grupo DAG + 5%S (20.36 pixeles por mm²), pero al cuantificar en el grupo DAG + 5%S + CAF (30.42 pixeles por mm²) vemos que existe diferencia estadísticamente significativa entre estos tres grupos y que además el grupo DAG + 5%S + CAF muestra diferencia con los grupos (AIN-93 + 5%S 14.94 pixeles por mm² y AIN-93 + 5% S + CAF 19.84 pixeles por mm²).

6.8.3. Cantidad total de microglia activa:

En cuanto a la cantidad de microglia activa (Fig. 22 C), podemos observar que los grupos Control (89.96 cél/mm²), DAG + 5%S (85.96 cél/mm²) y DAG + 5%S + CAF (81.92 cél/mm²) no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos y solo observamos incrementos en los grupos AIN-93 + 5%S (137.7 cél/mm², ****p<0.0001 vs Control) y AIN -93 + 5%S + CAF (164.10 cél/mm², ****p<0.0001 vs Control).

6.8.4. Cantidad de SIRT1 en microglia activa

Al cuantificar la intensidad para la señal de SIRT1 en la microglia activa (Fig. 22E), se puede observar que el grupo Control (25.21 pixeles por mm²) presenta diferencia estadísticamente significativa contra los grupos: DAG + 5% S (16.03 pixeles por mm²), DAG + 5%S + CAF (29.84 pixeles por mm²), AIN-93 + 5%S (13.60 pixeles por mm²) y AIN-93 +5% S + CAF (29.26 pixeles por mm²). Por otro lado los grupos que muestran un mayor contenido de SIRT1 son los grupos DAG + 5%S + CAF y AIN-93 + 5%S + CAF que son los grupos a los que se les incluyó la combinación de alimentos funcionales.



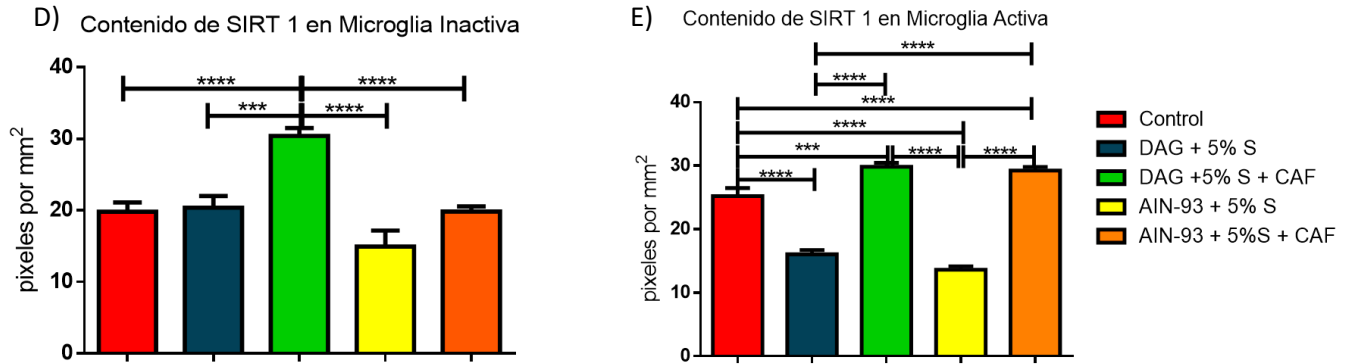


Figura 22. Clasificación de microglia y cuantificación de SIRT1 en la corteza prefrontal medial de ratas adultas obesas. A) se muestran imágenes representativas de microglia inactiva y activa en corteza prefrontal medial. B) clasificación de la microglia en los diferentes grupos experimentales. Las columnas representan la media más menos el error estándar (ANOVA de una vía y un post test Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$). C) Cuantificación de SIRT1 en microglia activa e inactiva en los diferentes grupos experimentales. Las columnas representan la media más menos el error estándar (ANOVA de una vía y un post test Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

6.9. Correlaciones entre el nivel de SIRT1 y los diferentes parámetros medidos

Finalmente para entender de mejor manera si los cambios observados en las pruebas conductuales, la cantidad de astrocitos y microglia estaban relacionados con el incremento de SIRT1, decidimos realizar la correlación de los niveles de SIRT1 y los parámetros antes mencionados.

La correlación empleada para saber la relación entre la cantidad de SIRT1 en los diferentes grupos de experimentación y su desempeño en las pruebas conductuales que utilizamos en este proyecto fue la correlación Pearson, la cual mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas y su coeficiente va de 0 a 1, se dice que existe una correlación mientras el valor del coeficiente sea lo más cercano a 1.

En la figura 23 A se muestra la correlación que existe entre el contenido de SIRT1 y el porcentaje de alternancia, en el laberinto en forma de T. el coeficiente de Pearson obtenido para esta medición fue de 0.94, indicando que a mayor contenido de SIRT1 se obtiene un mayor porcentaje de alternancia. Otra conducta que se analizó respecto al contenido de SIRT1 fue el reconocimiento de objeto novedoso (Fig. 23B), en esta correlación se obtuvo un coeficiente de 0.97, lo que indica una clara relación entre el índice de discriminación y el contenido de SIRT1. Con estos resultados se puede inferir que el mejoramiento en el desempeño conductual se debe en gran medida al incremento en SIRT1 y dicho incremento tuvo lugar en los grupos experimentales que fueron alimentados con la combinación de alimentos funcionales (DAG + 5%S + CAF y AIN-93 + 5%S + CAF).

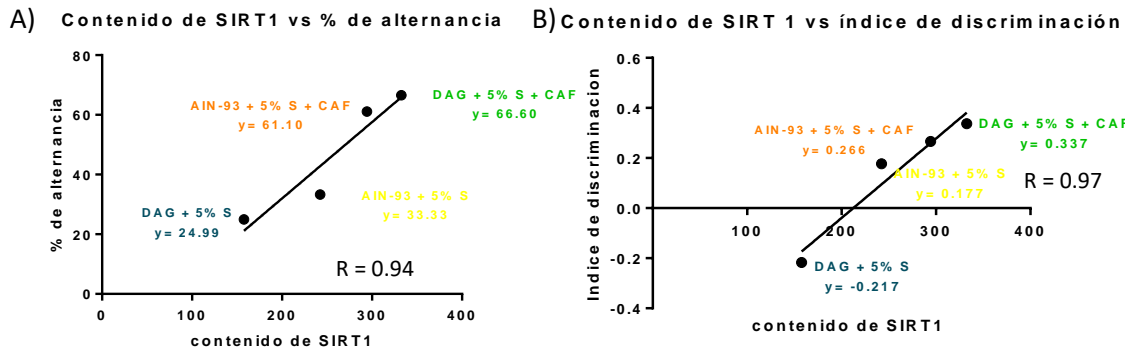
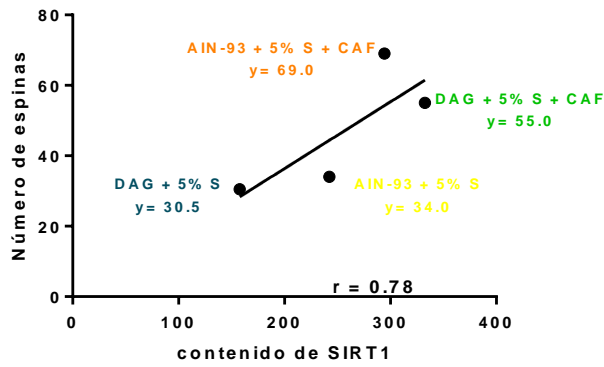


Figura 23. Correlación de la cantidad de SIRT1 y el desempeño en el laberinto en forma de T y RON. En A) podemos observar la correlación entre el contenido de SIRT1 y el porcentaje de alternancia en el laberinto en forma de T. En B) se muestra la correlación entre el contenido de SIRT1 y el índice de discriminación obtenido en la tarea de reconocimiento de objeto novedoso. Los datos fueron analizados con una correlación de Pearson obteniendo un coeficiente de correlación de 0.89 para A) y 0.94 para B).

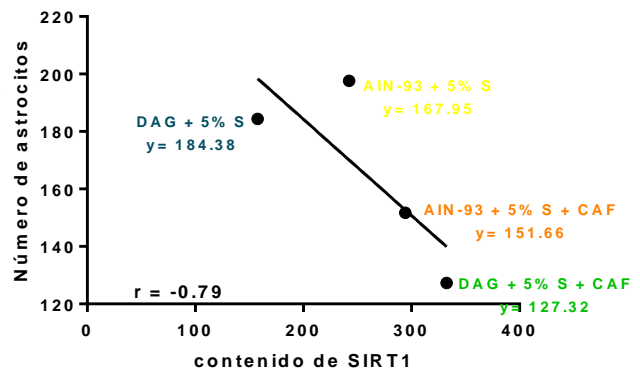
Así como correlacionamos los resultados de las pruebas conductuales, decidimos ver si también se podía correlacionar el contenido de SIRT1 con los cambios observados a nivel histológico, utilizando también la correlación de Pearson.

La primera correlación que realizamos fue la del contenido de SIRT1 y el número de espinas dendríticas, en la cual se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.78, lo cual indica que si existe una correlación entre ambas variables. La siguiente correlación se realizó con el contenido de SIRT1 y el número de astrocitos en la cual se obtuvo un coeficiente de correlación de -0.79, indicando que entre ambas variables existe una correlación negativa, es decir que a mayor contenido de SIRT1 menor cantidad de astrocitos. Finalmente realizamos la correlación entre el número de microglía y el contenido de SIRT1 en esta correlación el coeficiente obtenido fue de 0.67, si bien es cierto que existe una correlación entre ambas variables, esta no es tan marcada como en las otras dos antes mencionadas.

Contenido de SIRT 1 vs Número de espinas



Contenido de SIRT1 vs Número de astrocitos



Contenido de SIRT1 vs Número de microglia

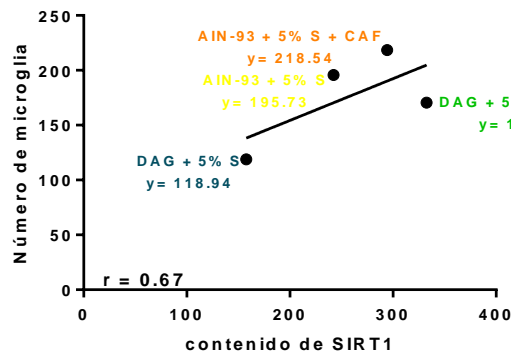


Figura 24. Correlación entre el contenido de SIRT1, el número de espinas dendríticas, número de astrocitos y el número de microglia. En A) se muestra la correlación entre el contenido de SIR1 y el número de espinas dendríticas en la corteza prefrontal medial en ratas obesas adultas. En B) se muestra la correlación entre el contenido de SIRT1 y el número de astrocitos en la corteza prefrontal medial de ratas Wistar obesas adultas. En C) se muestra la correlación entre el contenido de SIRT1 y el número de microglia en la corteza prefrontal medial de ratas Wistar obesas adultas.

7. Discusión

Diversos grupos de investigación han demostrado que la ingesta de una dieta alta en grasa puede causar deterioro cognitivo ya que produce metilación aberrante del DNA (Barrés et al., 2009) así como una desregulación en genes involucrados en la formación de la memoria y el metabolismo energético (ej. Ppargc1a, Ppp1cb, Reln y Sirt1) (Heyward et al., 2016).

Recientemente se ha propuesto que la estimulación de SIRT1 podría representar un blanco terapéutico para disminuir las alteraciones cognitivas causadas por la obesidad. Actualmente se sabe que SIRT1 juega un papel importante en diferentes funciones cerebrales. En este trabajo se incluyeron varios alimentos funcionales (nopál, chíá, soya y cúrcuma), los cuales inducen un incremento en la expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial (ej. PGC-1, PPAR γ), mismos que son modulados por SIRT1.

En el presente proyecto observamos que la obesidad inducida por una dieta alta en grasa provoca alteraciones a nivel metabólico, ya que incrementó los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, además, disminuye el desempeño en pruebas conductuales relacionadas con la memoria de trabajo. Estas alteraciones fueron revertidas por la inclusión de una combinación de alimentos funcionales (CAF), incluso en presencia de la dieta alta en grasa. Esto se ve asociado al incremento en el número de espinas tipo hongo, relacionadas con el aprendizaje y la formación de memoria: (Yuste & Bonhoeffer, 2001).

Por otra parte, la presencia de SIRT1 en células de la CPFm también disminuyó en las ratas obesas, lo que se vio revertido en los grupos que recibieron una CAF. Aún falta establecer cómo es que los alimentos funcionales utilizados en este proyecto provocan un incremento de SIRT1 así como el estado de activación de dicha enzima, pero evidencia experimental indica que la curcumina incrementa no solo la cantidad de SIRT1 si no también su actividad (Miao et al., 2016).

Para tratar de entender este incremento en SIRT1 en la CPFm a causa de la ingesta de los alimentos funcionales, decidimos segregar el tipo celular mayormente afectado. Observamos que en las ratas obesas existe un incremento en el número de astrocitos, mientras que la CAF causa una disminución en los mismos. Llama la atención que cuando los animales obesos dejaron de ingerir dieta DAG y tuvieron solo acceso a dieta control, no lograron disminuir el número de astrocitos significativamente en comparación con ratas obesas. Esto indica que el ambiente obesogénico promueve una proliferación astrocítica, el cual tiene efectos a largo plazo. Los incrementos en la inmuno-reactividad para GFAP, marcador específico de astrocitos reactivos, se ha relacionado con los procesos de neuroinflamación y neurodegeneración (Diaz, Mendieta, Zenteno, Guevara, & Limon, 2011; Zhang et al., 2012). Sin embargo, se ha observado que un aumento en SIRT1 en astrocitos les confiere un efecto neuroprotector al incrementar la expresión de enzimas

antioxidantes y disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias (Cheng 2014). Para poder entender si este incremento en GFAP estaba relacionado con un mayor metabolismo energético mediado por SIRT1, se realizó un doble marcaje de dichas células con un anticuerpo contra SIRT1. Observamos que la presencia de SIRT1 es inversamente proporcional al número de astrocitos en la CPFm de los diferentes grupos, ya que en ratas control con pocos astrocitos los niveles de SIRT1 es alto (los pocos astrocitos están metabólicamente muy activos), mientras que en las ratas obesas quienes presentan un mayor número de astrocitos, la reactividad para SIRT1 presente en sus núcleos es baja. Por otro lado, al igual que en los resultados anteriores, el retorno a una dieta control no es suficiente para mejorar los niveles de SIRT1 en los astrocitos ya que estos permanecen bajos en comparación con el grupo control. Esto indica que los alimentos funcionales, no solo logran abatir la proliferación astrocítica, sino que mejorar su actividad metabólica, quizás confiriéndoles así un efecto neuroprotector (Cheng, 2014).

Otro tipo celular involucrado en los procesos de neuroinflamación en modelos de obesidad, es la microglia. En este proyecto se utilizó el anticuerpo Iba-1, un marcador específico para microglia. Al contabilizar el número de células positivas a Iba-1 observamos que el grupo obeso muestra una disminución en comparación con el grupo control, mientras que la adición de CAF incremento aun mayormente el número de células positivas a Iba-1 al ser comparado con las ratas obesas. Más aun, el grupo que regresó a dieta control (AIN-93 + 5%S), y el grupo que se suplementó con CAF (AIN-93 + 5%S +CAF) muestran incrementos aún mayores en comparación a los demás grupos experimentales. Estos datos resultaron inesperados, puesto que se ha reportado que la proliferación microglial está relacionada con procesos de neuroinflamación. Sin embargo, recientemente se ha demostrado un papel neuroprotector de estas células, inmunoprotectoras del sistema nervioso central (Lim et al., 2013). Lim y colaboradores demostraron que la microglia desempeña un papel neuroprotector, ya que induce la formación de sinapsis nuevas en neuronas de hipocampo al producir un incremento en la interleucina 10, una citosina antiinflamatoria. Para poder entender estos datos más claramente, decidimos clasificar la microglía en activa e inactiva de acuerdo a reportes ya previos (Streit, Xue, Tischer, & Bechmann, 2014). En este caso, se observó que la microglia inactiva se comporta como se había descrito para el conteo de la microglia total (disminuye en las ratas obesas, aumenta con alimentos funcionales). Pero para el caso de la microglia activa, los datos fueron ligeramente distintos. Ya no se observan cambios entre los grupos control, obeso y obeso con alimentos funcionales, pero aumenta cuando se da una dieta control y se suplementa con alimentos funcionales. Esto pudiera indicar que es la microglia de morfología inactiva la que ejerce una modulación en la función sináptica y funciones neuroprotectoras. Más aún, se observó un aumento en los niveles de SIRT1 en la microglia de ratas alimentadas con CAF. Recientemente, Cho y cols reportaron que una reducción en los niveles de SIRT1 genera alteraciones funcionales y genera disfunción microglia, perdiendo así su función neuroprotectora (Cho et al., 2015).

Finalmente para entender mejor los resultados generados en este proyecto se evaluó la relación entre el contenido de SIRT1 y los diferentes marcadores celulares y cognitivos. Se utilizó una correlación de Pearson la cual nos permite saber si existe una correlación entre dos variables; el valor de su coeficiente va de 0 a 1 y el grado de correlación resulta mayor cuanto más cercano a 1 sea el valor del coeficiente obtenido. Los resultados en dichas correlaciones muestran que tanto los cambios a nivel conductual y los cambios a nivel histológico están directamente relacionados a la cantidad de SIRT1 presente en la corteza prefrontal de ratas Wistar obesas adultas. Es decir, a mayores niveles de SIRT1 mejor función cognitiva, más número de espinas dendríticas, y mayor de microglia inactiva. El único parámetro que mostró una relación inversa fue el número de astrocitos, pero como explicamos anteriormente, una sobre activación astrocítica genera radicales libre y neuroinflamación que es peyorativa para la función neuronal y las funciones cognitivas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente proyecto sugieren que el tratamiento con alimentos funcionales puede ser una buena alternativa para disminuir las alteraciones tanto metabólicas como cognitivas causadas por el consumo de una dieta alta en grasas saturadas y azúcar. Aún falta por entender el efecto de cada uno de los alimentos y su mecanismo de acción. Sin embargo, el presente trabajo es el primer reporte que comprueba que la ingesta de alimentos funcionales modula la expresión de SIRT1 ofreciendo un efecto neuroprotector en ratas obesas.

8. Conclusión

Con este proyecto podemos concluir que el consumo de una dieta alta en grasa provoca alteraciones a nivel metabólico así como también a nivel cognitivo. Más aún, se observaron alteraciones en la CPFm, como una reducción en el número de espinas dendríticas, de los niveles de SIRT1, y un incremento en la neuroinflamación. El regreso a una dieta control durante tres meses después de 4 meses con dieta alta en grasa provoca una mejora a nivel metabólico, pero no a nivel cognitivo. Esto indica que el ambiente obesogénico tiene efectos a largo plazo en la neuroanatomía y función cerebral.

Por último, al incluir alimentos funcionales a la dieta, no solo se produce mejorías a nivel metabólico sino también a nivel cognitivo, ya que provocan un incremento en espinas dendríticas, en el contenido de SIRT1 y una disminución en el número de astrocitos. Aunque es cierto que se ve un incremento en la microglia, recientemente se ha manejado el concepto de que la microglia puede jugar un papel neuroprotector debido a que produce un incremento en los niveles de interleucina 10, un citocina con importantes efectos anti-inflamatorios.

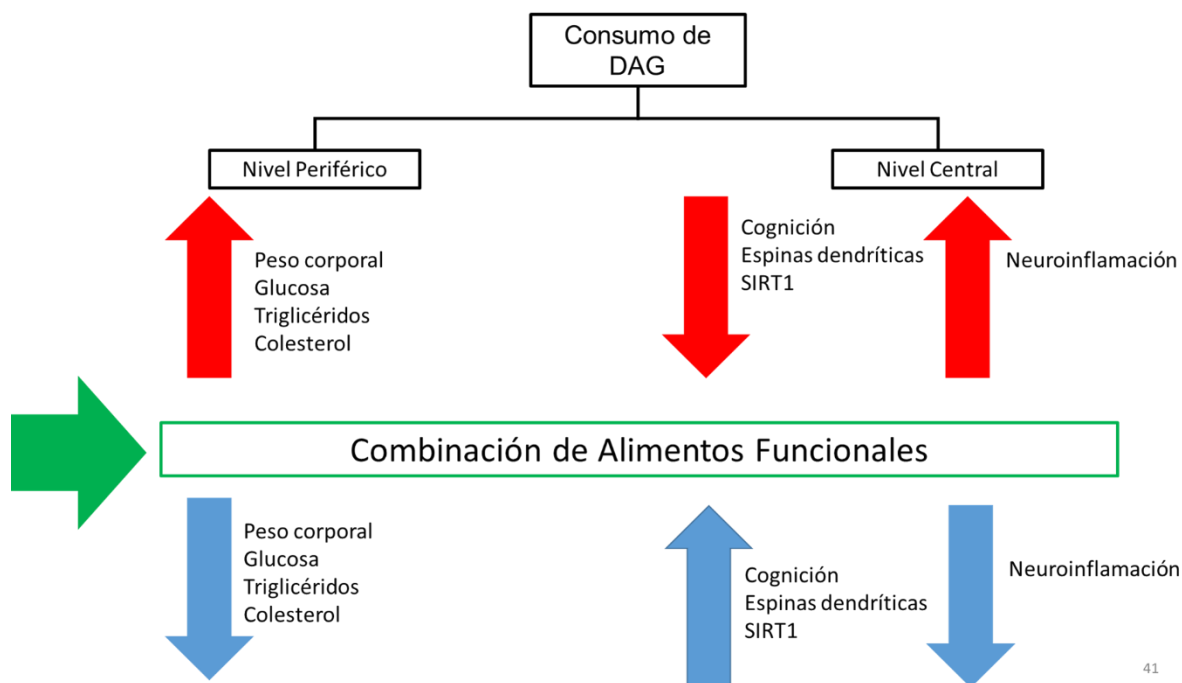


Figura 25. Resumen grafico de la conclusión. En este esquema podemos apreciar las alteraciones provocados por el consumo de una dieta alta en grasa (indicados con flechas rojas), mismas que después de incluir en la dieta un combinación de alimentos funcionales a base de nopal, aceite de chía, soya y cúrcuma se ven revertidas. Proponiendo así que el consumo de alimentos funcionales podría ser una alternativa tanto para la obesidad como para el síndrome metabólico.

9. *Perspectivas*

- Evaluar la actividad de SIRT1 en la corteza prefrontal de ratas con síndrome metabólico.
- Colocalizar SIRT1 en neuronas principales e inter-neuronas en la corteza prefrontal de ratas con síndrome metabólico.
- Cuantificar los niveles de IL10 en la corteza prefrontal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y la combinación de alimentos funcionales.

10. Referencias

- Allegra, M., Carletti, F., Gambino, G., Tutone, M., Attanzio, A., Tesoriere, L., ... Livrea, M. A. (2015). Indicaxanthin from opuntia ficus-indica crosses the blood-brain barrier and modulates neuronal bioelectric activity in rat hippocampus at dietary-consistent amounts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(33), 7353–7360. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02612>
- Andrea S. Rossi et al. (2013). Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats. *British Journal of Nutrition*, *109*(9), 1617–1627. <http://doi.org/10.1017/S0007114512003558>
- Arnoldussen, I. A., Kiliaan, A. J., & Gustafson, D. R. (2012). Obesity and dementia: adipokines interact with the brain. *Eur Neuropsychopharmacol*, *100*(2), 130–134. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
- Avila-Nava, A., Noriega, L. G., Tovar, A. R., Granados, O., Perez-Cruz, C., Pedraza-Chaverri, J., & Torres, N. (2016). Food combination based on a pre-hispanic Mexican diet decreases metabolic and cognitive abnormalities and gut microbiota dysbiosis caused by a sucrose-enriched high-fat diet in rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, *c*, 1–13. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201501023>
- Bocarsly, M. E., Fasolino, M., Kane, G. A., LaMarca, E. A., Kirschen, G. W., Karatsoreos, I. N., ... Gould, E. (2015). Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *2*(week 8), 201511593. <http://doi.org/10.1073/pnas.1511593112>
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvant, J., Aubert, A., Castanon, N., Layé, S., & Ferreira, G. (2014). Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *40*, 9–17. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.005>
- Braidy, N., Poljak, A., Grant, R., Jayasena, T., Mansour, H., Chan-Ling, T., ... Guillemain, G. J. (2015). Differential expression of sirtuins in the aging rat brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(May), 167. <http://doi.org/10.3389/fncel.2015.00167>
- Butler, M. P., O'Connor, J. J., & Moynagh, P. N. (2004). Dissection of tumor-necrosis factor- α inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early - But not late - Phase LTP. *Neuroscience*, *124*(2), 319–326. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.11.040>
- Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., & Arias, C. (2014). Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and*

Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 34(6), 1001–8. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.48>

- Carroll, K. K., & Kurowska, E. M. (1995). Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *The Journal of Nutrition*, 125(3 Suppl), 594S–597S.
- Chicco, A. G., D'Alessandro, M. E., Hein, G. J., Oliva, M. E., & Lombardo, Y. B. (2009). Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 101(1), 41. <http://doi.org/10.1017/S000711450899053X>
- Cho, S.-H., Chen, J. a., Sayed, F., Ward, M. E., Gao, F., Nguyen, T. a., ... Gan, L. (2015). SIRT1 Deficiency in Microglia Contributes to Cognitive Decline in Aging and Neurodegeneration via Epigenetic Regulation of IL-1. *Journal of Neuroscience*, 35(2), 807–818. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2939-14.2015>
- Codocedo, J. F., Allard, C., Godoy, J. a., Varela-Nallar, L., & Inestrosa, N. C. (2012). SIRT1 Regulates Dendritic Development in Hippocampal Neurons. *PLoS ONE*, 7(10), e47073. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047073>
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*, 37(9), 608–620. <http://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
- Cordiglieri, C., & Cinthia, F. (2010). Astrocytes Exert and Control Immune Responses in the Brain. *Current Immunology Reviews*. Journal. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/157339510791823655>
- Craig A, J., & Forey, J. P. (2011). *Atlas of Atherosclerosis and Metabolic Syndrome*. *Atlas of Atherosclerosis and Metabolic Syndrome*.
- de la Monte, S. M., & Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 548–559. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.012>
- Diaz, A., Mendieta, L., Zenteno, E., Guevara, J., & Limon, I. D. (2011). The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(1), 67–75. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.005>
- Dingess, P. M., Darling, R. A., Kurt Dolence, E., Culver, B. W., & Brown, T. E. (2016). Exposure to a diet high in fat attenuates dendritic spine density in the medial prefrontal cortex. *Brain Structure and Function*. <http://doi.org/10.1007/s00429-016-1208-y>
- Doherty, G. H. (2011). Obesity and the ageing brain: Could leptin play a role in neurodegeneration? *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 2011. <http://doi.org/10.1155/2011/708154>
- Finkel, T., Deng, C.-X., & Mostoslavsky, R. (2009). Recent progress in the biology

and physiology of sirtuins. *Nature*, 460(7255), 587–591.
<http://doi.org/10.1038/nature08197>

González, H., Elgueta, D., Montoya, A., & Pacheco, R. (2017). Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 274(1), 1–13. JOUR. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>

Gzielo, K., Kielbinski, M., Ploszaj, J., Janeczko, K., Gazdzinski, S. P., & Setkowicz, Z. (2016). Long-Term Consumption of High-Fat Diet in Rats: Effects on Microglial and Astrocytic Morphology and Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression. *Cellular and Molecular Neurobiology*.
<http://doi.org/10.1007/s10571-016-0417-5>

Heyward, F. D., Gilliam, D., Coleman, M. A., Gavin, C. F., Wang, J., Kaas, G., ... Sweatt, J. D. (2016). Obesity Weighs down Memory through a Mechanism Involving the Neuroepigenetic Dysregulation of Sirt1. *Journal of Neuroscience*, 36(4), 1324–1335. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1934-15.2016>

Julien, C., Tremblay, C., Émond, V., Lebbadi, M., Jr, N. S., Bennett, D. a, & Calon, F. (2010). SIRT1 Decrease Parallels the Accumulation of tau in Alzheimer Disease, 68(1), 1–26. <http://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181922348.SIRT1>

Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553.
<http://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>

Kullmann, S., Heni, M., Hallschmid, M., Fritsche, A., Preissl, H., & Häring, H.-U. (2016). Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans. *Physiological Reviews*, 96(4), 1169 LP-1209.
<http://doi.org/10.1152/physrev.00032.2015>

Lim, S. H., Park, E., You, B., Jung, Y., Park, A. R., Park, S. G., & Lee, J. R. (2013). Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. *PLoS ONE*, 8(11), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081218>

Lima, L. C. F., Saliba, S. W., Andrade, J. M. O., Cunha, M. L., Cassini-Vieira, P., Feltenberger, J. D., ... Santos, S. H. S. (2016). Neurodegeneration Alters Metabolic Profile and Sirt 1 Signaling in High-Fat-Induced Obese Mice. *Molecular Neurobiology*. <http://doi.org/10.1007/s12035-016-9927-x>

López-Romero, P., Pichardo-Ontiveros, E., Avila-Nava, A., Vázquez-Manjarrez, N., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J., & Torres, N. (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 Different Composition Breakfasts. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(11), 1811–1818. <http://doi.org/10.1016/j.jand.2014.06.352>

Luo, X., & Chen, S. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease, 1–13.

Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC :

what makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease*, 5(6), 209–223.

Mellendijk, L., Wiesmann, M., & Kiliaan, A. J. (2015). Impact of nutrition on cerebral circulation and cognition in the metabolic syndrome. *Nutrients*, 7(11), 9416–9439. <http://doi.org/10.3390/nu7115477>

Mesa C, M. et al. (2000). Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma longa* L. extracts and curcuminoids. *Ars Pharmaceutica*, 413, 307–321.

Miao, Y., Zhao, S., Gao, Y., Wang, R., Wu, Q., Wu, H., & Luo, T. (2016). Curcumin pretreatment attenuates inflammation and mitochondrial dysfunction in experimental stroke: The possible role of Sirt1 signaling. *Brain Research Bulletin*, 121, 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.11.019>

Mockus-sivickas, I. (2010). Mecanismos celulares en respuesta al estrés: sirtuinas, 58(3), 221–232.

Moon, J. H. (2016). Endocrine Risk Factors for Cognitive Impairment. *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)*, 185–192. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27118278>

Moran-Ramos, S., Avila-Nava, a., Tovar, a. R., Pedraza-Chaverri, J., Lopez-Romero, P., & Torres, N. (2012). *Opuntia ficus indica* (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats. *Journal of Nutrition*, 142(11), 1956–1963. <http://doi.org/10.3945/jn.112.165563>

Omoto, J. J., Lovick, J. K., & Hartenstein, V. (2016). Origins of glial cell populations in the insect nervous system. *Current Opinion in Insect Science*, 18, 96–104. <http://doi.org/10.1016/j.cois.2016.09.003>

Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F. X., Barroso, E., Pallàs, M., ... Camins, A. (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(9), 1687–1699. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.004>

Porras-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M. T., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 571–577. <http://doi.org/10.1111/ijfs.12339>

Potter, S. M. (1995). Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *The Journal of Nutrition*, 125(3 Suppl), 606S–611S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884541>

Pratchayasakul, W., Sa-nguanmoo, P., Sivasinprasasn, S., Pintana, H., Tawinvisan, R., Sripetchwandee, J., ... Chattipakorn, S. C. (2015). Obesity accelerates cognitive decline by aggravating mitochondrial dysfunction, insulin resistance

- and synaptic dysfunction under estrogen-deprived conditions. *Hormones and Behavior*, 72, 68–77. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.023>
- Rodríguez-Rodríguez, C., Torres, N., Gutiérrez-Urbe, J. a, Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Leal-Díaz, A. M., ... Tovar, A. R. (2015). The effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food & Function*, 6(3), 805–15. <http://doi.org/10.1039/c4fo01092b>
- Rojas, R., Aguilar-Salinas, C. a, Jiménez-Corona, A., Shamah-Levy, T., Rauda, J., Ávila-Burgos, L., ... Lazcano Ponce, E. (2010). Metabolic syndrome in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México*, 52(2), S11–S18. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342010000700004>
- Rusinek, H., & Covit, A. (2015). Cerebral Damage in Obesity-Associated Metabolic Syndrome. *Nat Rev Endocrinol*, 33(4), 395–401. <http://doi.org/10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus>
- Saunders, L. R., & Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, 26(37), 5489–5504. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210616>
- Serra, L., & Aranceta, J. (2002). Guía de alimentos funcionales. *Sociedad Española Nutrición Comunitaria. Instituto Omega 3. Confederación de Consumidores Y Usuarios.*, 2–14.
- Serralde-Zúñiga, A. E., Guevara-Cruz, M., Tovar, A. R., Herrera-Hernández, M. F., Noriega, L. G., Granados, O., & Torres, N. (2014). Omental adipose tissue gene expression, gene variants, branched-chain amino acids, and their relationship with metabolic syndrome and insulin resistance in humans. *Genes & Nutrition*, 9(6), 410–431. <http://doi.org/10.1007/s12263-014-0431-5>
- Shi, T., Zhao, D., Wang, H., Feng, S., Liu, S., Xing, J., ... Zhao, M. (2013). A New Chiral Pyrrolyl α -Nitronyl Nitroxide Radical Attenuates β -Amyloid Deposition and Rescues Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Neurotherapeutics*, 10(2), 340–353. <http://doi.org/10.1007/s13311-012-0168-z>
- Siddiqui, S. V., Chatterjee, U., Kumar, D., Siddiqui, A., & Goyal, N. (2008). Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian Journal of Psychiatry*, 50(3), 202–208. JOUR. <http://doi.org/10.4103/0019-5545.43634>
- Stanić, Z. (2016). Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge – A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. <http://doi.org/10.1007/s11130-016-0590-1>
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(2), 175–194. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200400071>
- Streit, W. J., Xue, Q.-S., Tischer, J., & Bechmann, I. (2014). Microglial pathology. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 142. <http://doi.org/10.1186/s40478-014-0142-6>

- Thaler, J. P., & Schwartz, M. W. (2010). Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: The hypothalamus heats up. *Endocrinology*, *151*(9), 4109–4115. <http://doi.org/10.1210/en.2010-0336>
- Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., ... Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, *69*(9), 421–433. <http://doi.org/10.1002/syn.21832>
- Val-laillet, D., Layec, S., Guérin, S., Meurice, P., & Malbert, C. (2009). Changes in Brain Activity After a Diet-Induced Obesity *. *Obesity*, *19*(4), 749–756. <http://doi.org/10.1038/oby.2010.292>
- Wolozin, B. (2001). A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(10), 5371–5373. <http://doi.org/10.1073/pnas.101123198>
- Yaffe, K., Lindquist, K., Simonsick, E. M., Harris, T., Shorr, R. I., Tylavsky, F. A., & Newman, A. B. (2015). The Metabolic Syndrome , Inflammation , and Risk of Cognitive Decline, *292*(18), 2237–2242.
- Yamamoto, H., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2007). Sirtuin Functions in Health and Disease. *Molecular Endocrinology*, *21*(8), 1745–1755. <http://doi.org/10.1210/me.2007-0079>
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with Long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, *24*, 1071–89.
- Zare, R., & Hosseinkhani, A. (2016). Functional Food in Traditional Persian Medicine, *41*(3), 2016.
- Zhang, W., Bai, M., Xi, Y., Hao, J., Zhang, Z., Su, C., ... Li, Z. (2012). Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiology of Aging*, *33*(11), 2661–2677. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.023>
- Zlokovic, B. V., Jovanovic, S., Miao, W., Samara, S., Verma, S., Farrell, C. L., ... California, S. (2016). Differential Regulation of Leptin Transport by the and Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier *. *Endocrinology*, *141*(4), 1434–1441.