



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**MEMORIA VISUOESPACIAL Y DE  
RECONOCIMIENTO EN RATAS CON  
INFLAMACIÓN CRÓNICA DE BAJO GRADO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**Carla Gabriela Soto Muñoz**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. David E. García Díaz**

**REVISOR: Dr. César Casasola Castro**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. David Erasmo García Díaz. Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave del proyecto IN216119), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto No. 255635). Agradezco al CONACyT la beca recibida (Número de becario: 26064 Carla Gabriela Soto Muñoz).

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Psicología por todos estos valiosos años de aprendizaje y formación profesional.

Al Dr. David García por la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y apoyarme en todo momento con este proyecto, así como sus atinados comentarios y asesoría en todo momento. A los miembros de mi sínodo, por sus acertados y valiosos comentarios, observaciones y preguntas. A la Biol. Isabel Arenas Reyes por su apoyo técnico esencial para la realización de esta tesis. A Karina Bermeo y a Antonio Barajas por la orientación, comentarios y apoyo a lo largo del proyecto.

A mi amiga y Psic. Carolina Hernández por su apoyo durante la realización y revisión de las pruebas ocupadas en este trabajo. Al Sr. Luis Martínez por su apoyo incondicional como auxiliar del laboratorio. Gracias por su amabilidad y por todas esas horas de trabajo y convivencia que tuvimos en el laboratorio.

A los miembros del laboratorio por el apoyo y los comentarios acerca de este proyecto, gracias a todos por ser parte de esta etapa académica. A la Dra. Leticia Verdugo de la Facultad de Medicina por prestarnos su laboratorio y equipo de medición de presión arterial en rata. A Guillermo Luna, por la construcción de los laberintos ocupados en esta tesis.

A mi familia por apoyarme todo este tiempo, en especial a mis padres, Carlos Soto y María Muñoz, gracias por el sacrificio, la paciencia y el apoyo para concluir esta etapa de mi vida. A mis hermanos Consuelo, Angela y Carlos, por sus comentarios y apoyo incondicional. A Adrian Castro, por creer siempre en mi y apoyarme en cada decisión tomada desde el inicio. A Azael Castro, mi precioso bebé que llegó a dar el último impulso para concluir esta etapa. No saben cuánto los amo. Este logro no solo es mío, sino de todos.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas que han sido parte de mi formación académica. A mis excelentes profesores que sin duda tendría que hacer una enorme lista para mostrar mi agradecimiento y por supuesto, a mis compañeros y amigos dentro de la facultad, gracias por todos esos años de aprendizaje.

# ÍNDICE

## Resumen

I.	Introducción.....	6
II.	Antecedentes .....	9
1.	Inflamación crónica de bajo grado.....	9
2.	Modelos animales de inflamación crónica de bajo grado.....	11
3.	Aprendizaje y memoria.....	12
4.	Citocinas y alteraciones cognitivas.....	15
5.	Evaluación de alteraciones cognitivas en modelos animales .....	18
III.	Planteamiento del problema.....	21
IV.	Hipótesis.....	22
V.	Objetivos.....	22
VI.	Método.....	23
VII.	Resultados.....	42
VIII.	Discusión.....	63
IX.	Conclusiones.....	70
	Referencias.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA:** Análisis de varianza

**CRP:** Proteína C Reactiva

**DAS:** Dieta alta en sacarosa

**DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2

**ENSANUT:** Encuesta Nacional de Salud Pública

**HFD:** dieta alta en grasas

**IL-6:** Interleucina 6

**IL- $\beta$ :** Interleucina  $\beta$

**INSP:** Instituto Nacional de Salud Pública

**IPGTT:** Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

**IR:** Índice de Reconocimiento

**LB:** Laberinto de Barnes

**LTD:** Depresión a largo plazo

**LTP:** Potenciación a largo plazo

**MCP:** Memoria a corto plazo

**MLP:** Memoria a largo plazo

**NOR:** Reconocimiento de Objetos Novedosos

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SM:** Síndrome Metabólico

**TNF $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$

## RESUMEN

La inflamación crónica de bajo grado es una condición caracterizada por la elevación de niveles circulantes de citocinas inflamatorias como la proteína C-reactiva (CRP) y el factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), así como la infiltración de macrófagos a tejidos periféricos sin inducir lesión o pérdida de funcionalidad de tejido. Este tipo de inflamación a su vez está estrechamente relacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas como obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), síndrome metabólico (SM), los cuales se han convertido en un problema de salud pública en México. Asimismo, numerosas investigaciones sugieren que esta condición puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de deficiencias en los procesos cognitivos tales como el aprendizaje y la memoria.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue determinar si existe una relación temporal entre el desarrollo de la inflamación crónica de bajo grado y la alteración en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR) y de Laberinto de Barnes (LB). Para ello se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, a los cuales se les administró una dieta estándar y una dieta alta en sacarosa (DAS) al 20% p/v. a lo largo de 40 semanas.

Los resultados muestran que las ratas sometidas a una DAS presentan alteraciones propias del SM, así como elevación en la concentración de CRP y  $\text{TNF}\alpha$  en las semanas 20 y 40 de tratamiento, lo cual indica la presencia de un estado inflamatorio crónico de bajo grado.

En la parte cognitiva, no se encontraron alteraciones en la curva de aprendizaje, sin embargo, se obtuvieron menores índices de reconocimiento de objetos a las 20 semanas con

DAS, dicho resultado correlaciona moderadamente con la concentración de TNF $\alpha$  en sangre. Estos resultados sugieren que el aumento de biomarcadores de inflamación a nivel periférico podría orientar hacia una alteración central, la cual puede estar afectando la memoria de reconocimiento en las ratas tratadas con una DAS.

**Palabras Clave:** síndrome metabólico, inflamación crónica de bajo grado, prueba de reconocimiento de objetos novedosos, laberinto de Barnes.



## I. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un componente central de la inmunidad innata. Clásicamente, se trata de la respuesta local ante una lesión física, un proceso infeccioso o una respuesta inmunitaria local (Murphy, Travers y Allport, 2009; Minihane et al., 2015), dirigido a aislar el tejido afectado, destruir las células dañadas y restaurar la integridad tisular (Correale y Villa, 2004), así como a la defensa del tejido por la producción de: sustancias citotóxicas, quimiocinas para el reclutamiento de poblaciones de células inmunitarias específicas y de citocinas para la coordinación de las respuestas inmunes de las células del estroma locales, de la vasculatura y del sistema inmunológico propio (Carson, Doosem Melchor, Schmid y Ploix, 2006).

En general, la fase aguda de la inflamación lleva a la recuperación desde la infección hasta la curación, retornando a su estado normal en pocos días. Sin embargo, hay ocasiones en que, el proceso puede convertirse en un estado inflamatorio crónico de bajo grado (Murphy et al., 2009), el cual es una característica patológica de afecciones metabólicas como: el SM, obesidad y DM (Minihane et al., 2015), donde existen niveles elevados de biomarcadores inflamatorios, como: proteínas de fase aguda, citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y adipocinas (Wärnberg, Cunningham et al., 2011).

Por otra parte, se ha sugerido que la función cerebral es susceptible a los efectos de la inflamación crónica de bajo grado, desempeñando un papel en el desarrollo de deficiencias en los procesos cognitivos (Almeida-Suhett, Graham, Chen y Deuster, 2017). Teniendo a su vez, importantes implicaciones para la salud pública en México, debido a la prevalencia cada vez mayor de los trastornos metabólicos. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud

Pública (INEGI) a través de la Encuesta nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), en 2018 se reportó que, a nivel nacional el porcentaje de adultos mayores de 20 años que presentan obesidad es de 36.1%, mientras que el 39.1% presenta obesidad. Por otra parte, el 10.3% cursa con DM, así como el 18.4 reportó tener Hipertensión y el 19.5% triglicéridos y colesterol elevados.

Por lo tanto, el propósito de esta tesis fue mostrar si la presencia de marcadores de inflamación crónica de bajo grado se relaciona con la alteración en el desempeño en tareas de memoria visuoespacial y de reconocimiento.

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. Inflamación crónica de bajo grado**

La inflamación crónica de bajo grado se diferencia de la respuesta inflamatoria clásica, ya que ésta se caracteriza por la elevación en los niveles circulantes de proteínas de fase aguda y citocinas con actividad inflamatoria, así como el aumento en la infiltración de células inmunes en tejido insulino dependiente sin inducir lesión estructural o funcional en el tejido (León Pedroza et al., 2015).

Existe una fuerte asociación entre este tipo de inflamación y las alteraciones metabólicas, llegando a considerarse una característica principal de la obesidad, hipertensión arterial, DM2, Dislipidemia e hiperglucemia, que en su conjunto dan pie al SM (Shabab et al., 2016; Hamasaki, Machado y Pinheiro da Silva, 2017; León Pedroza et al., 2015). Esto es debido a que, uno de los primeros mecanismos implicados en la aparición de este cuadro

inflamatorio es consecuencia del exceso de grasa, el cual a su vez provoca la hipertrofia de adipocitos y el reclutamiento de numerosas células inmunológicas como los macrófagos, desde la periferia hacia el tejido adiposo, para iniciar así la producción de biomarcadores inflamatorios como el TNF $\alpha$  (Calder et al., 2013; Lasselin y Capuron, 2014; León Pedroza et al., 2015).

De igual manera, estados metabólicos alterados como la dislipidemia y la hiperglucemia pueden inducir una respuesta inflamatoria en el macrófago a través de la activación de receptores tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés *toll like receptor*)-1, 2, 4 y 6 localizados en la superficie del macrófago en respuesta a la unión de estos con los ácidos grasos libres y los productos terminales de glucosilación avanzada, característicos de estas patologías (León Pedroza et al., 2015; Koop et al., 2009), induciendo así la liberación de citocinas inflamatorias (Hotamisligil y Erbay, 2008).

Durante este cuadro inflamatorio, los tejidos adiposos, hepático y muscular sufren infiltración de macrófagos inflamatorios productores de TNF $\alpha$ , lo cual interfiere directamente con la capacidad de estos tejidos para responder a la insulina, provocando así una respuesta compensatoria inadecuada durante la hiperinsulinemia, seguida de la claudicación y apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas, desembocando en una disminución de los niveles de insulina y por consecuencia en el establecimiento de la DM2 (León Pedroza et al., 2015).

Algunos parámetros de la respuesta inflamatoria pueden ser medidos en plasma, siendo la PCR el marcador más comúnmente utilizado debido a su alta sensibilidad ya que es el principal mediador de la respuesta de fase aguda después de un evento inflamatorio y

se sintetiza principalmente mediante la biosíntesis hepática dependiente de interleucina 6 (IL-6) y que a su vez es fuertemente asociado con la obesidad y el SM (Sproston y Ashworth, 2018). De igual manera, las citocinas proinflamatorias como IL-6, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) han sido también asociados con obesidad y componentes del SM (Wärnberg, Cunningham et al., 2011).

## 2. Modelos animales de inflamación crónica de bajo grado.

Debido a que la inflamación crónica de bajo grado es un cuadro común en diferentes alteraciones metabólicas, se han utilizado modelos animales donde se induce esta condición inflamatoria a través de una aproximación experimental de enfermedades crónicas como el caso del SM, que es un conjunto de datos fisiopatológicos como dislipidemia, hipertensión, obesidad, hiperinsulinemia, enfermedades cardiovasculares y procesos proinflamatorios (Rojas et al., 2010). En este tipo de modelos se realiza una modificación a la dieta de ratas y ratones que es rica en grasas o alta en carbohidratos como la sacarosa (Long et al., 2017).

Dieta alta en grasas (DAG): Se realiza un aumento que habitualmente varía entre el 30 y 60% de grasa en la dieta que consiste en manteca de cerdo, aceite de pescado, oliva o soya, así como grasa de coco o mantequilla (Larqué et al., 2011). En general, se ha observado que el aumento en la ingesta de grasa genera un aumento de peso corporal y tejido adiposo, así como un aumento en el nivel de ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina. Esto da lugar a obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperlipidemia e hipertensión, así como inflamación persistente en tejidos metabólicos periféricos (Larqué, 2011; Long et al., 2017).

Dieta alta en sacarosa (DAS): consiste en la administración de una dieta elevada en sacarosa por medio del agua para beber, y de esta forma inducir SM. Asimismo, se ha utilizado con variaciones que van del 10% al 65% p/v en la concentración de sacarosa y en el tiempo de exposición a esta dieta (Noble y Kanoski, 2016; Martínez, 2011). En estudios previos, el grupo tratado con este modelo mostró diferencias significativas respecto al control en variables como peso, consumo de alimento e ingesta de agua, índice de masa corporal, grasa abdominal, niveles de insulina, triglicéridos, así como en la presión arterial y curvas de tolerancia a la glucosa. De igual manera se han reportado alteración en la liberación de factores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno (Larqué et al., 2011).

En la presente investigación se utilizó el modelo DAS a 20% (p/v) descrito por Larqué, con ratas macho de la cepa Wistar; cabe mencionar que la cepa de ratas utilizada se seleccionó porque esta no muestra susceptibilidad genética hacia el desarrollo de obesidad o DM. De acuerdo con la caracterización de este modelo, las ratas desarrollan SM a las ocho semanas de tratamiento con sacarosa (Larqué et al., 2011).

### 3. Aprendizaje y memoria.

El aprendizaje es el proceso por el cual se adquiere nueva información o conocimiento (Bermúdez y Prado, 2001). Éste, es un mecanismo biológico para enfrentar al mundo cambiante, el cual permite al organismo evolucionar a nuevas formas de conducta de un modo rápido. (Kandel, Schwartz y Jessell, 1997). Este cambio está estrechamente relacionado con la memoria, que es el proceso por el cual retenemos y recurrimos al conocimiento adquirido previamente para utilizar esa información en el presente (Tulving, 2000).

Específicamente, se han identificado tres operaciones comunes de la memoria: codificación, almacenamiento y recuperación, cada una de ellas representa una etapa en el procesamiento de la memoria. Durante la codificación se transforman los datos sensoriales en una forma de representación mental, en el almacenamiento se conserva la información codificada en la memoria, y en la recuperación se extrae o utiliza la información almacenada en la memoria (Sternberg, 2011). Dichos procesos son posibles a través de cambios persistentes en las relaciones neuronales, ya sea por modificaciones estructurales y/o eventos bioquímicos en el interior de las neuronas, lo cual determina los cambios en la comunicación neuronal.

- Memoria Visuoespacial.

Es la capacidad de recuperar información sobre el entorno o contexto, para orientarse y ubicarse a través de claves visuales (Sharma, Rakoczy y Brown-Borg, 2010) cuyo objetivo final es el almacenamiento de la representación espacio-perceptual de los lugares a los que se expone un animal (Kandel, 2007). La evocación de esta información, para la solución de tareas, requiere de la asociación entre las características sensoriales del medio ambiente y las señales visuoespaciales. La memoria visuoespacial se ha visto como una de las principales funciones cognitivas que se ven afectadas en modelos animales donde se inducen alteraciones metabólicas (Dinel et al., 2011).

Los estudios de pacientes con lesiones en los lóbulos temporales proveen evidencia de que la memoria declarativa y la consolidación de la información están relacionadas con el lóbulo temporal medial, en especial con el hipocampo. Existen estudios que reportan un notable deterioro en el aprendizaje y memoria espacial en roedores con lesión del hipocampo,

evaluados a través de laberintos, siendo el hipocampo derecho el que se ha relacionado específicamente con las tareas espaciales (Klur et al., 2009).

- Memoria de Reconocimiento.

La memoria de reconocimiento es la capacidad para identificar con precisión un estímulo, objeto, persona o situación en particular como algo ya vivido o visto anteriormente y en la cual están implicados dos procesos: la familiaridad y el recuerdo (Fernández, 2005). Ambos procesos fueron descritos en un principio por Atkinson y Joula en la década de 1970, siendo la familiaridad un proceso rápido de reconocimiento, mientras que por otro lado el recuerdo se refiere a un proceso más lento para recuperar información detallada específica (Stern y Hasselmo, 2009).

Posteriormente, Endel Tulving en 1983 propuso que el reconocimiento podría dividirse en “recolección” o recordar y “familiaridad” o conocer. Proponiendo que el proceso de recolección implica la recuperación de la experiencia episódica previa al encuentro con el estímulo a recordar, incluyendo los detalles contextuales asociados con ese evento. Del mismo modo, la familiaridad es propuesta como un proceso que no se basa en ningún recuerdo explícito de los detalles del contexto espacial o temporal del evento anterior (Stern y Hasselmo, 2009).

El papel del hipocampo en la memoria de reconocimiento ha sido objeto de intenso debate, sin embargo, existe un amplio acuerdo de que los aspectos más complejos de la memoria de reconocimiento, incluidos los aspectos de la recolección, contextuales, asociativos y espaciales de la memoria de reconocimiento, se basan en el hipocampo.

La posición dominante indica que el hipocampo juega un papel crítico en el procesamiento de las relaciones entre elementos discretos, principalmente en representaciones de vínculos de elementos a información contextual (Olsen, Moses, Riggs y Ryan, 2012). Varios autores han asociado los procesos de unión apuntalados por el hipocampo con el concepto de recolección episódica, mientras que la memoria de reconocimiento para elementos individuales puede lograrse por procesamiento de familiaridad en regiones extrahipocampales (Bird, 2017).

Asimismo, se ha reportado que el hipocampo está implicado en el reconocimiento de objetos cuando se emplean retrasos extensos, lo que podría indicar que el hipocampo es importante para el mantenimiento de las representaciones de objetos, mientras que cuando se emplean demoras cortas, el desempeño en tareas de reconocimiento de objetos no suele verse afectado por el daño al hipocampo (Soares et al., 2013).

Estudios en humanos y animales en donde se utilizan pruebas conductuales, de registro, de imágenes y lesiones indican que la memoria de reconocimiento implica al menos dos procesos separables, la discriminación de familiaridad y el recuerdo, y que la corteza perirrinal está particularmente involucrada en la discriminación de familiaridad para elementos individuales y en el almacenamiento de representaciones de objetos que luego se pueden usar para diferenciar objetos particulares durante la recuperación de la memoria (Soares et al., 2013).

#### 4. Citocinas y alteraciones cognitivas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular el cual varía de 8 a 30 kDA y que son producidas principalmente por células del sistema inmunológico como los monocitos,



macrófagos, mastocitos, linfocitos, aunque también por otras células como fibroblastos, células endoteliales, neuronas y adipocitos, cuya función es regular la comunicación entre las células inmunes y la respuesta inflamatoria del organismo (Wärnberg, Romero et al., 2011; Arisi, 2014).

Mientras que a nivel de SNC las citocinas desempeñan un papel importante en la cognición, en particular en el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo, como es el caso de la memoria espacial, el reconocimiento de objetos y el condicionamiento del miedo contextual (McAfoose y Baune, 2009), su desregulación influye directamente en dichos procesos cognitivos produciendo deterioro cognitivo (Gomez-Smith et al., 2016).

Dentro de las citocinas proinflamatorias más estudiadas por su impacto en la cognición se encuentran la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral $\alpha$  (TNF $\alpha$ ):

- La familia de IL-1 bajo condiciones fisiológicas puede desempeñar un papel en los procesos de consolidación de la memoria. En general, las concentraciones basales de IL-1 $\beta$  son necesarias para el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y la función adecuada de memoria dependiente de hipocampo, y cualquier desbalance de este rango fisiológico como la sobreexpresión de esta citocina, inhibe la LTP y da como resultado un deterioro en la memoria (McAfoose y Baune, 2009; Goshen et al., 2007).

- La IL-6 es un importante regulador de la neurogénesis y es esencial para el aprendizaje espacial. Se ha observado que ratones transgénicos adultos que sobreexpresan IL-6 presentan una reducción del 63% en la neurogénesis de la

circunvolución dentada del hipocampo (Valliéres, Campbell, Gage y Sawchenko, 2002). Del mismo modo, en el envejecimiento normal y en enfermedades neurodegenerativas la sobreexpresión de IL-6 puede interferir con el funcionamiento cognitivo al alterar la neurogénesis (McAfoose y Baune, 2009).

- El TNF $\alpha$  en condiciones inmunológicas óptimas es esencial para las funciones normales de memoria y aprendizaje (Baune et al., 2008), ya que regula a la alza los receptores del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), cuya estabilidad y ciclo en las sinapsis son esenciales tanto en la LTP como en la depresión a largo plazo (LTD). Asimismo, se ha observado que los niveles fisiopatológicos de TNF $\alpha$  en un tiempo prolongado contribuyen a la desregulación de la homeostásis sináptica inhibiendo la LTP en el giro dentado de ratas (Stellwagen y Malenka, 2006); del mismo modo, en modelos transgénicos donde se sobreexpresa TNF $\alpha$  se ha demostrado que este produce deterioro cognitivo (McAfoose y Baune, 2009) a través la memoria espacial a largo plazo. De igual manera, la inhibición de la síntesis de TNF $\alpha$  puede restaurar la función cognitiva desde una perspectiva conductual y celular (Belarbi et al., 2012).

Estos hallazgos van de la mano con la evidencia encontrada en pacientes que cursan con enfermedades asociadas con inflamación, como es el caso de la obesidad, en donde se ha evidenciado un estado inflamatorio crónico (Rummel, Inoue, Poole y Huheshi, 2010); asimismo, se ha asociado tanto a las desregulaciones metabólicas como a las alteraciones en la conducta puesto que conduce a una disfunción en regiones cerebrales vulnerables asociadas con la regulación del estado de ánimo, el aprendizaje y la memoria, especialmente en el hipocampo.

En estudios con humanos se ha observado que la obesidad y/o el aumento en la adiposidad abdominal se asocian con una puntuación reducida en el Mini-Mental State Examination (MMSE) y en pruebas de memoria o funciones ejecutivas (Gunstad, Lhotsky, Wendell, Ferrucci y Zonderman, 2010; Elias, Elias, Wolf, y D'Angostino, 2003).

Por otra parte, en estudios donde se induce a las ratas un estado de SM por medio de dietas altas en grasa (Dinel et al., 2011) o alta en sacarosa (Molteni et al., 2002), se ha observado que estas presentan déficits en funciones cognitivas, siendo la memoria dependiente de hipocampo una de las principales funciones cognitivas que se ve afectada por el SM, en especial la memoria visuoespacial. Estas alteraciones también podrían estar asociadas a inflamación crónica de bajo grado y activación de citocinas en ciertas zonas del cerebro (Dinel et al., 2011; Arisi, 2014).

##### 5. Evaluación de alteraciones cognitivas en modelos animales

El estudio de las alteraciones cognitivas ha dado pie a múltiples métodos y pruebas utilizadas en animales de experimentación, mayoritariamente en primates, ratas y ratones, ya que sus procesos neuronales y funciones cognitivas son similares a los de la especie humana. En este proyecto se abordaron principalmente las pruebas de conducta para evaluar memoria visuoespacial y de reconocimiento.

El aprendizaje espacial y la memoria de los roedores de laboratorio comúnmente se evalúan a través de la habilidad de navegación en laberintos.

a) Laberinto de Barnes

Dentro de los diferentes protocolos existentes para la evaluación de la memoria visoespacial en ratas, la literatura especializada muestra que los protocolos más comunes son: el Laberinto Radial de Olton y Samuelson, y el Laberinto Acuático de Morris creadas en 1976 y 1984 respectivamente. Otro protocolo que ha sido ampliamente aceptado para evaluar tanto aprendizaje como memoria espacial dependiente del hipocampo en ratas, además de permitir estudiar la memoria de trabajo, memoria de referencia, memoria a corto y largo plazo, es el Laberinto de Barnes creada por Carol Barnes en 1979 (Navarrete et al., 2008), el cual cuenta con grandes ventajas en comparación de los anteriores ya que no involucra un factor estresante como la privación de alimento, en el caso del Laberinto Radial de Olton y Samuelson, y el nado como en el Laberinto de Morris.

Este protocolo ha mostrado ser sensible a cambios en la memoria y el aprendizaje visoespacial, tal como se muestra en un estudio reciente donde se utilizó el laberinto de Barnes para evaluar el deterioro conductual en un modelo animal de Alzheimer con ratas transgénicas, el cual reporta que las ratas transgénicas presentan anomalías progresivas dependiente de la edad en el aprendizaje espacial y memoria (Cohen et al., 2013).

b) Prueba de reconocimiento de objetos novedosos.

Por otra parte, para evaluar la memoria de reconocimiento, es decir la capacidad para reconocer un estímulo presentado anteriormente, se cuenta con diferentes pruebas, como es el caso la tarea de campo abierto, la prueba de no igualación a la muestra con demora (DNMS por sus siglas en inglés) y la prueba de Reconocimiento de Objetos Novedosos (NOR, por sus siglas en inglés). Estas pruebas evalúan el comportamiento de los animales cuando se

expone a un objeto novedoso y otro familiar. En DNMS, los animales aprenden que si eligen el objeto nuevo serán recompensados mientras que en NOR, no hay recompensas y los animales exploran el objeto nuevo de acuerdo a su propensión natural a la novedad y es posible evaluar el índice de reconocimiento de estímulo (Baxter, 2010).

La Prueba de NOR creada en 1977, también conocida como prueba de reconocimiento de objetos, o prueba de reconocimiento espontáneo de objetos es una prueba muy utilizada para evaluar el comportamiento, percepción y de memoria de reconocimiento en roedores. Cabe destacar que esta prueba es atractiva para la investigación ya que no requiere privación de alimentos o de agua, no está motivada de manera aversiva y la duración de la capacitación y las pruebas son relativamente cortas. De la misma manera, es atractiva por la variedad de estímulos que se pueden utilizar, su validez ecológica a través de las especies y la escasa necesidad de manipulaciones motivacionales (Blaser y Heyser, 2015). Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a experimentar nuevos objetos y ambientes, y compararlos con otros que les son familiares. Al exponer al ratón a una serie de objetos se espera a que éste los explore y se mide el tiempo de exploración, que se define como el periodo durante el cual el animal olisquea o toca el objeto con las patas delanteras a una distancia menor o igual a 1 o 2 cm (Navarrete et al., 2008).

Del mismo modo, se ha mostrado NOR es una prueba adecuada para detectar alteraciones en la memoria en estudios de envejecimiento y modelos animales de Alzheimer. En este último caso se ha reportado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al deterioro de la memoria en ratas transgénicas (Cohen et al., 2013), así como trastornos en la memoria a corto plazo (Olszewski et al., 2016) utilizando la prueba de NOR.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente existe un aumento alarmante en la prevalencia de las alteraciones que cursan con inflamación crónica de bajo grado, como es el caso del SM, el cual tiene como característica frecuente la presencia de déficits en la memoria y el aprendizaje (Lasselin y Capuron, 2014). Estudios recientes sugirieron que la inflamación crónica de bajo grado está relacionada con el desarrollo de deficiencias en los procesos cognitivos tal es el caso del aprendizaje y la memoria (Almeida-Suhett et al., 2017), con importantes implicaciones para la salud pública en México y en el mundo.

Sin embargo, existe poca literatura especializada que informe sobre la relación que existe entre la inflamación crónica de bajo grado y las alteraciones en la memoria visuoespacial y de reconocimiento; del mismo modo, no hay estudios que relacionen estas alteraciones con los niveles  $TNF\alpha$ . En este estudio se propone además como control positivo de inflamación inespecífica a la medición de los niveles de CRP.

Tomando en cuenta los antecedentes y el aumento en la prevalencia de trastornos metabólicos, resulta relevante estudiar en un modelo animal la relación que existe entre la elevación de los niveles de  $TNF\alpha$  y CRP, como indicador de inflamación crónica de bajo grado, y las alteraciones cognitivas en aprendizaje y memoria, con la finalidad de comprender, prevenir y tratar adecuadamente esta fisiopatología.

Con base en lo anterior, la pregunta de investigación de esta tesis es: ¿existe una relación temporal entre el desarrollo de la inflamación crónica de bajo grado y el deterioro en la prueba de NOR y en el laberinto de Barnes?

#### **IV. HIPÓTESIS.**

H0: Las ratas que cursen con inflamación crónica de bajo grado no presentarán deficiencias en el rendimiento de la prueba de NOR y del laberinto de Barnes.

H1: Las ratas que cursen con inflamación crónica de bajo grado presentarán deficiencias en el rendimiento de la prueba de NOR y del laberinto de Barnes.

#### **V. OBJETIVOS.**

Objetivo general.

Determinar si existen diferencias en la memoria espacial y en la memoria de reconocimiento, en un grupo de ratas macho adultas que cursan con elevación de los niveles de TNF $\alpha$  y CRP inducida por síndrome metabólico, con respecto de un grupo control sano.

Objetivos particulares.

1. Verificar que las ratas sometidas a la DAS sean positivas a CRP, como marcador inespecífico de inflamación.
2. Determinar si las ratas positivas a CRP presentan elevación en la concentración de TNF $\alpha$ .
3. Determinar si las ratas que son positivas a TNF $\alpha$  y CRP presentan alteraciones en la prueba de NOR y de laberinto de Barnes.

## **VI. MÉTODO.**

### **Sujetos:**

Se utilizaron 34 ratas macho de la cepa Wistar, con ocho semanas de edad y 250 gr aproximadamente de peso, proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Asimismo, se trasladaron al laboratorio de Biofísica de membranas y células troncales ubicado en el quinto piso de la torre de Investigación perteneciente a la Facultad mencionada anteriormente. Los animales fueron tratados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el uso, cuidado y reproducción de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Las ratas se mantuvieron en parejas por cada caja, bajo condiciones de humedad y temperatura ambiente (entre 21 y 23°C), con ciclos de luz-oscuridad 12/12 h.

### **Dieta:**

Se proporcionaron dos tipos de dieta, según fue el caso.

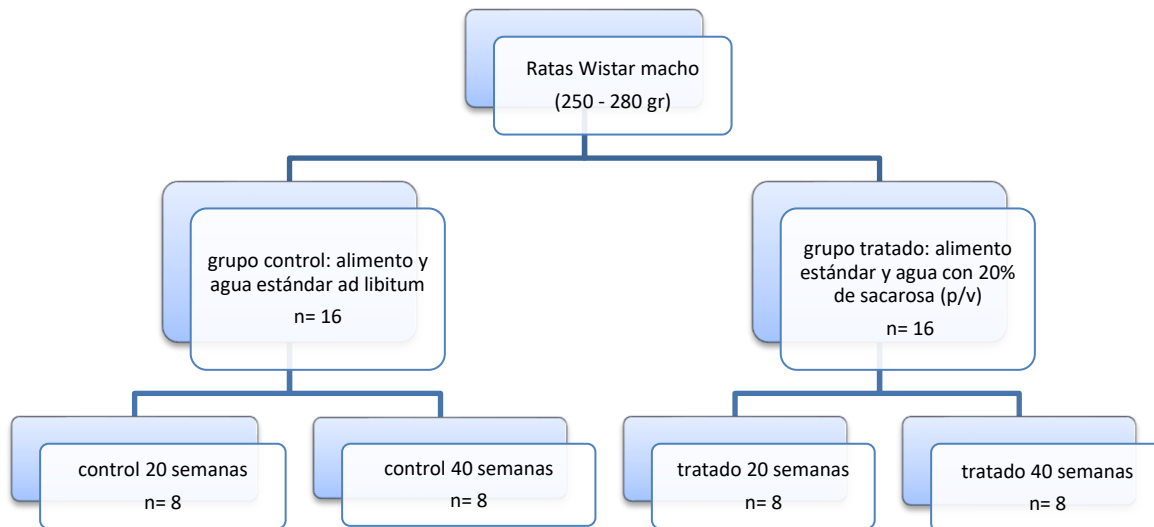
La dieta para el grupo control fue constituida por alimento estándar chow pellet (Rodent Laboratory Chow, 5001) y agua *ad libitum*. Mientras que al grupo experimental se les suministró una dieta alta en sacarosa, compuesta por el alimento estándar antes mencionado y sacarosa al 20% (p/v) en el agua *ad libitum* con la finalidad de inducir una condición de SM, el cual cursa con inflamación crónica de bajo grado. Asimismo, ambos grupos se dividieron en dos de acuerdo con el tiempo que se mantuvieron con la dieta asignada.

### **Grupos:**



La asignación de los grupos se realizó al azar, de igual manera, se formaron dos principales grupos de acuerdo con la dieta administrada y cuatro subgrupos con base en el tiempo de exposición a la misma (Figura 1).

- Grupo control 20 semanas: 8 ratas Wistar macho con ciclo luz-oscuridad 12: h y acceso libre a comida y agua durante 20 semanas.
- Grupo control 40 semanas: 8 ratas Wistar macho con ciclo luz-oscuridad 12: h y acceso libre a comida y agua durante 40 semanas.
- Grupo con DAS 20 semanas: 8 ratas Wistar con 20 semanas de dieta alta en sacarosa. Se comprobó que los roedores cursaran con SM al mostrar que son positivos en tres parámetros: intolerancia a la glucosa, triglicéridos elevados e hipertensión arterial.
- Grupo con DAS 40 semanas: 8 ratas Wistar con 40 semanas de dieta alta en sacarosa. Se comprobó que los roedores cursaran con SM al mostrar que son positivos en tres parámetros: intolerancia a la glucosa, triglicéridos elevados e hipertensión arterial.



*Figura 1.* Resumen de grupos experimentales. El grupo control recibió agua y alimento estándar, mientras que el grupo tratado recibió una DAS al 20% (p/v). Se ocuparon dos puntos de corte a las 20 y 40 semanas de tratamiento, donde se realizaron las mediciones metabólicas y pruebas conductuales.

### **Mediciones metabólicas:**

Medición de ingesta: Se realizó cada tercer día la cuantificación de la cantidad de alimento y agua ingeridas por las ratas de cada grupo.

Peso: A partir del inicio y hasta el final del tratamiento se realizó la medición semanal del peso de cada rata.

Triglicéridos: Para esta medición no fue necesario someter a los roedores a ningún tipo de ayuno. Se tomó una muestra de sangre de la vena lateral de la cola de la rata para posteriormente colocarla en el instrumento marca Accutrend® Plus para la medición cuantitativa de triglicéridos.

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT): Esta prueba se realizó en cada uno de los grupos anteriormente mencionados, con un ayuno previo de 12 horas, por lo

cual se retiró el alimento y la solución de sacarosa se cambió por agua natural en el caso de los grupos experimentales.

Para llevar a cabo esta prueba, en un principio se tomó una muestra de sangre con la finalidad de conocer los niveles de glucosa basales e inmediatamente se les suministró glucosa (2g/kg) por inyección intraperitoneal y posteriormente se tomaron muestras de sangre de la vena lateral de la cola de la rata a los 10, 20, 30, 60 y 120 minutos posteriores (Larqué et al., 2011). Las muestras de sangre fueron analizadas con el instrumento marca Accutrend® Plus para la medición cuantitativa de glucosa (Figura 2).



*Figura 2.* Instrumento para medición cuantitativa de Glucosa y Triglicéridos de la marca Accutrend® Plus.

Medición de presión arterial: Se utilizó el equipo y software CODA que es un sistema de monitoreo no invasivo de presión arterial en ratas, mediante la determinación del volumen de sangre. Se obtuvieron diferentes parámetros: presión arterial (sistólica y diastólica), frecuencia cardíaca, flujo y volumen sanguíneo en la cola de la rata (Figura 3).

Previo a esta medición se realizaron sesiones de habituación para cada rata durante 4 días consecutivos de 20 minutos cada uno y la medición se efectuó al quinto día, en un área con temperatura ambiente promedio de 23°C, lejos de ruidos fuertes para evitar estresar a los roedores. Posteriormente, para obtener la medición se colocaron tanto el soporte como el tubo de mango en su cola.

Al término de la medición, los datos fueron recopilados para el análisis posterior.

Esta medición se realizó en el Laboratorio de Bioelectromagnetismo de la Facultad de Medicina a cargo de la Dra. Leticia Verdugo.



*Figura 3.* Medición de presión arterial por medio del equipo CODA, que es un sistema de alto rendimiento para medir la presión arterial en ratas.

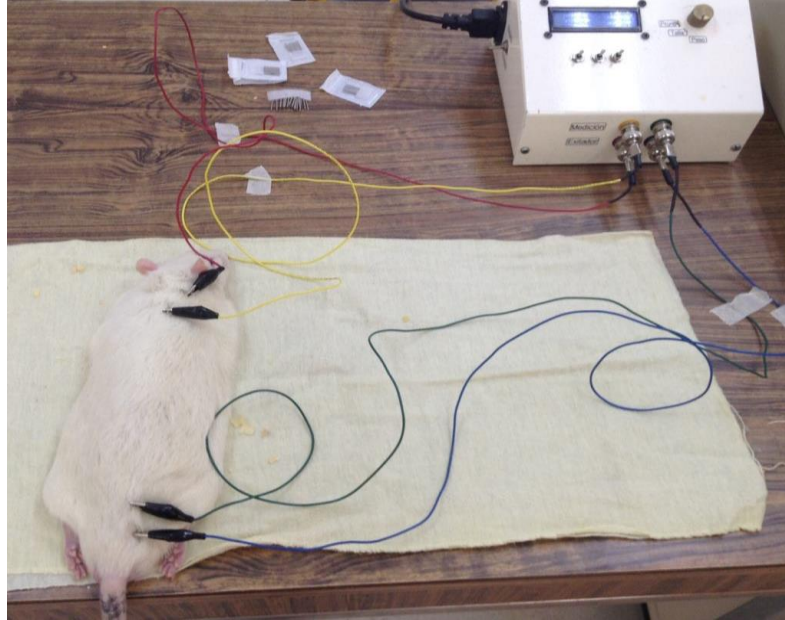
Composición corporal: Previo a la medición de composición corporal el roedor fue anestesiado con pentobarbital sódico (0.50 gr/kg de peso) para llevar a cabo el siguiente procedimiento:

Se colocó a la rata en posición prono-ventral en una superficie de plástico no conductor, se tomó en cuenta que los miembros superiores e inferiores se encontraran en un ángulo de 90° con respecto al cuerpo y su cola extendida distalmente.

Se ocuparon cuatro electrodos de aguja de acero, los cuales se insertaron por vía subcutánea 5 mm de profundidad en la parte dorsal de la rata, de la siguiente manera:

- Un electrodo de excitación marcado con color rojo fue colocado en la intersección imaginaria de la línea que va un pabellón auricular a otro con la línea que va de la punta de la nariz hacia la base de la cola.
- Un electrodo de medición color amarillo fue colocado a 1 cm de distancia con respecto al electrodo rojo distalmente de la cabeza.
- Otro electrodo de excitación indicado de color azul fue colocado en la intersección imaginaria de la línea que recorre la nariz a la base de la cola, con otra que recorre del músculo de un muslo a otro.
- Un último electrodo color verde se colocó a 1 cm de distancia del electrodo azul distalmente de la cola.

Una vez colocados los electrodos se conectaron al sistema de medición de composición corporal por impedancia (Salazar, 2011), el cual es un instrumento que utiliza el principio de impedancia (resistencia eléctrica al paso de la corriente alterna, constituida por las reactancias inductivas y capacitivas derivadas de las propiedades eléctricas pasivas de materiales, en este caso, biológicos y fisiológicos), inyectando una corriente no mayor a 800  $\mu$ A, a una frecuencia de 5 kHz y 50kHz para la excitación del tejido de la rata, con la finalidad de conocer los valores de: agua total, masa libre de grasa (masa magra), la masa de grasa y el agua extracelular (Figura 4).

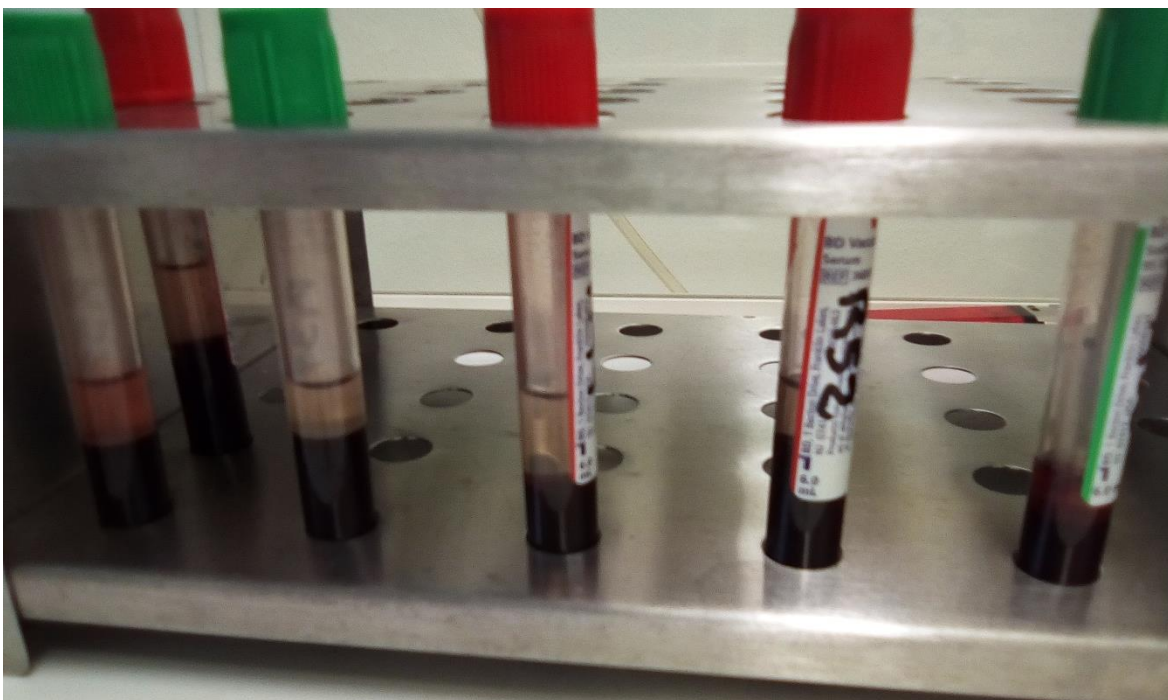


*Figura 4.* Instrumento de medición de composición corporal por impedancia.

Obtención y almacenamiento de las muestras: La extracción de sangre se llevó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Todos los roedores fueron sometidos a un ayuno de 12 horas en el cual se les retiró el alimento y el agua con solución de sacarosa, manteniéndolos solo con agua simple ad libitum. Posteriormente se les suministró una dosis única de pentobarbital sódico (.50 mg/kg de peso) para la extracción de la sangre de la vena cava superior.
2. Se recolectaron de 5 a 7 ml de sangre la cual fue vaciada en dos tubos BD vacutainer de 6 ml., uno rojo y otro verde con Heparina de Sodio para obtener suero y plasma respectivamente.

3. La sangre fue centrifugada a 2000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero y plasma de las muestras. Una vez obtenido éstos fueron guardados inmediatamente en tubos Eppendorf y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  aproximadamente (Figura 5).



*Figura 5.* Obtención de suero y plasma de las muestras sanguíneas.

Medición de insulina: Se utilizó el kit ELISA de la marca ALPCO, el cual es una técnica de inmunoensayo para la medición cuantitativa de insulina en rata a partir del plasma sanguíneo previamente obtenido (Figura 6). El cual es usado para la cuantificación no radiactiva de esta hormona y puede medir 39 muestras por duplicado.

Para el cálculo de resultados, se realizó una curva a partir de los calibradores que es la concentración de insulina que se conoce generalmente, calculándose la curva estándar y la determinación de la concentración de las muestras con ayuda de un programa de software (Graphpad prism 6).

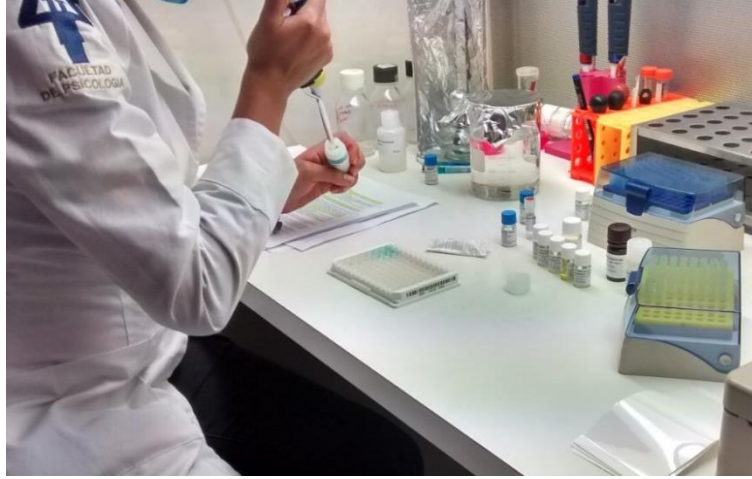


Figura 6. Realización de ELISA de Insulina marca ALPCO.

El procedimiento se llevó a cabo conforme se describe en el manual adjunto del kit (ALPCO, 2017) (Figura 7).

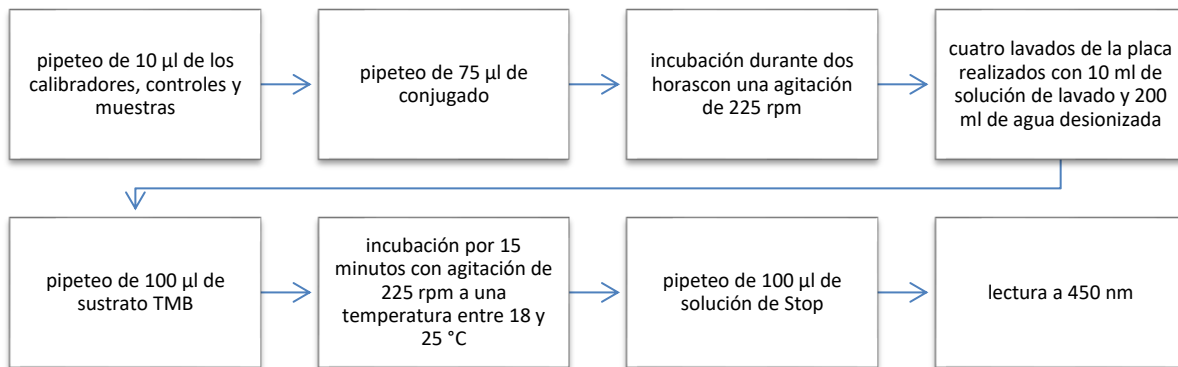


Figura 7. Resumen del protocolo utilizado de acuerdo con el manual adjunto del kit ELISA de la marca ALPCO para la medición cuantitativa de insulina en rata.

### Medición de memoria visuoespacial y de reconocimiento:

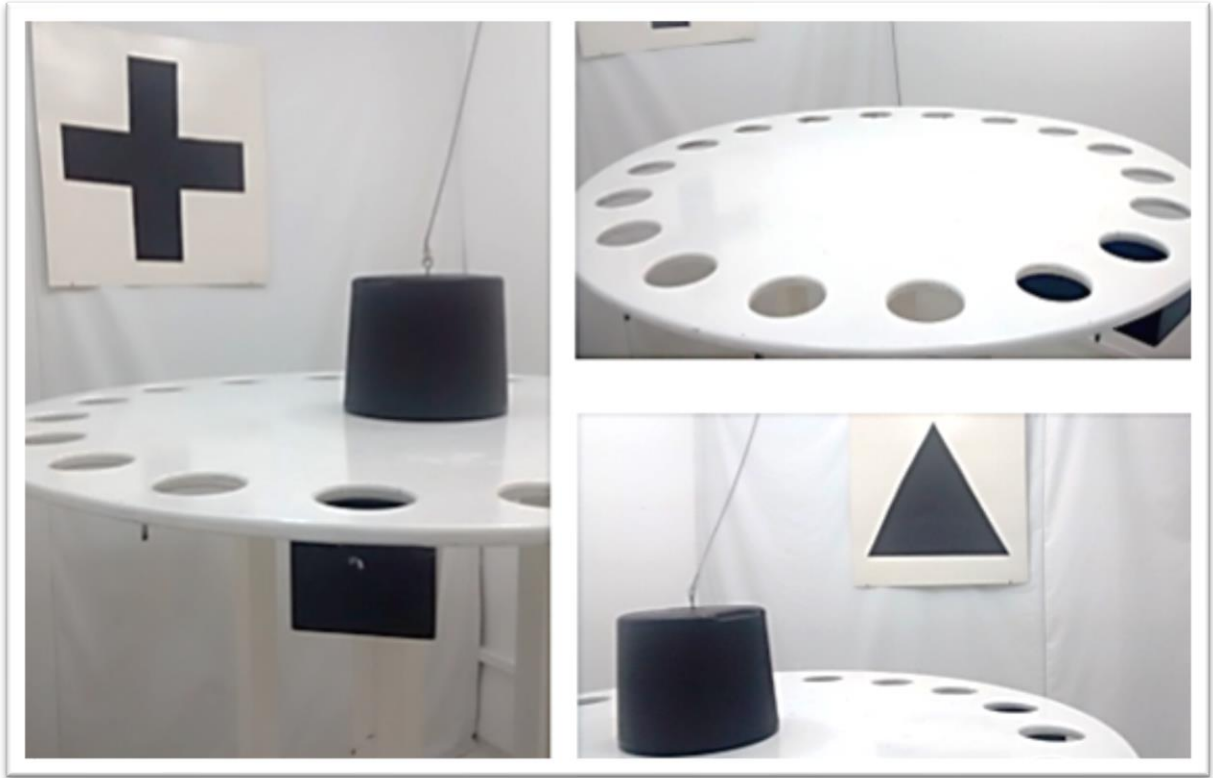


En la semana quince de tratamiento se realizaron las pruebas conductuales. Se eligieron las siguientes pruebas para evaluar memoria visuoespacial y de reconocimiento ya que no implican la restricción de alimento ni factores estresantes como es el caso del Laberinto Radial de Olton y Samuelson o el Laberinto Acuático de Morris respectivamente.

- Laberinto de Barnes.

El laberinto de Barnes consiste en una plataforma blanca circular de 122 cm de diámetro elevada a 120 cm, con 18 agujeros, espaciados uniformemente alrededor del perímetro de la plataforma, de un diámetro de 9 cm cada uno. Uno de los orificios dirige a la caja de escape (de 30 cm x 12 cm x 8 cm) que se encuentra colocada debajo. El laberinto se dispuso en una habitación totalmente blanca, con dos claves visuales en las paredes (una cruz y un triángulo negro) (Figura 8). Éste, se instaló con un foco de luz brillante (150 W) y un generador de ruido blanco (90 dB), los cuales se encendían al inicio del ensayo y se apagaban al finalizar la prueba. De igual forma, los ensayos fueron grabados con una cámara de video directo a la computadora. (Troncoso et al., 2010).

Los ensayos se realizaron durante el periodo de luz de las ratas, después de las 12:00 horas, sin un horario fijo.



*Figura 8.* Laberinto de Barnes y configuración de estímulos visuales del Laboratorio de Biofísica de Membranas y Células Troncales de la Facultad de Medicina.

#### Procedimiento:

Antes de comenzar con la fase y después de cada ensayo, la mesa del laberinto se limpió en su superficie y cada agujero usando una solución de alcohol al 70%. De igual forma se rotó la mesa sobre su eje central de manera azarosa cuidando que no coincidiera la caja de escape con el agujero anterior. Todo esto con el fin de evitar las señales olfativas.

#### Fase de habituación:

Con el objetivo de que las ratas se familiarizaran con la superficie del laberinto, se colocaron en el centro del laberinto dentro de una “cámara de inicio” que consiste en un cilindro color negro, con una altura de 30 cm por 22 cm de ancho por 10 segundos.

Una vez transcurrido este tiempo se retiraron la cámara de inicio, y se conectaron la luz y el zumbido, dejando que la rata explorara el laberinto durante 15 segundos. El estrés producido por estos estímulos indujo a la rata a buscar un espacio cerrado donde esconderse. Transcurridos los 15 segundos el experimentador intervino para guiar lentamente a la rata hacia la caja de escape. Una vez dentro se apagaron los estímulos aversivos, se dejó a la rata 10 segundos de permanencia en la caja de escape y posteriormente se terminó la fase.

#### Fase de entrenamiento:

Se realizó del día 2 al 5, iniciando 24 horas después de la habituación. Para iniciar el experimento, se colocó a la rata en una cámara de inicio al centro del laberinto por un periodo de aclimatación de 30 segundos. Posteriormente se inició la luz brillante y el zumbido al tiempo que se retiró la cámara de inicio de la rata.

La sesión terminó cuando la rata entró en la caja de escape o después de 4 minutos transcurridos. Una vez que la rata entró en la caja de escape, la luz y el zumbido se apagaron y se dejó que la rata permaneciera en la caja durante 10 segundos. El entrenamiento se repitió 4 veces al día con un período inter-ensayo de 15 a 20 minutos.

#### Periodo de reposo:

Tuvo una duración de tres días, los cuales comprendieron del día 6 al 8 del experimento, durante este tiempo las ratas no fueron manipuladas experimentalmente, únicamente se les dejó con agua y alimento ad libitum.

#### Evaluación de Memoria a Largo Plazo:

Se llevó a cabo el día 9, es decir al finalizar el periodo de reposo. Se siguió el mismo procedimiento que en los ensayos de entrenamiento, sin embargo, no se colocó la caja de escape. El sujeto debió lograr encontrarse con el hoyo de escape que le corresponde antes de 90 segundos. Se cuantificaron las veces que la rata metió la cabeza en alguno de los hoyos, tomando como correctos los dos hoyos que se encontraban a la derecha o izquierda del que la rata aprendió anteriormente en el que se encontraba la caja de escape.

Periodo de reversión:

Se realizó durante el día 10 y 13 del experimento. Se repitieron los pasos de la fase de entrenamiento, sin embargo, en esta fase la caja de escape se colocó a 180° de la ubicación original para todos los días y en todos los ensayos, con la finalidad de verificar que las ratas se habían guiado con las claves visuales (O'Leary y Brown, 2011).

Durante la prueba se registraron el número de errores y la latencia para entrar en la caja de objetivos utilizada para resolver el laberinto. Los errores se definieron como búsquedas en cualquier agujero que no tuviera la caja de escape. Las búsquedas incluyeron asomar la nariz y desviar la cabeza en un agujero, sin embargo, asomar la nariz sucesivamente en el mismo agujero no fue contado como errores repetidos. (Cohen et al., 2013).

- Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)

Procedimiento:

La prueba se realizó en una caja de reconocimiento con 90 x 90 x 45 cm de dimensión, situada en una habitación homogéneamente iluminada y con objetos que deben ser de similar

textura, color y tamaño, pero de distinta forma (Figura 9). Todos los objetos deben ser lo suficientemente pesados o fijados al suelo de modo que las ratas no puedan moverlas durante las pruebas. Antes de comenzar cada fase, la arena de reconocimiento, así como los objetos se limpiaron con una solución de alcohol al 70%, con la finalidad de evitar las señales olfativas.

Los ensayos se realizaron de igual manera durante el periodo de luz de las ratas, después de las 12:00 horas, sin un horario fijo.

#### Fase de habituación:

La rata se colocó en la arena de reconocimiento que es un campo abierto sin ningún objeto y se dejaron transcurrir 10 minutos con la finalidad que se familiarizaran con el entorno.

#### Fase de entrenamiento:

24 horas después de la habituación, las ratas se retiraron de su jaula de origen y se colocaron en la arena de reconocimiento de objetos en el cual previamente se colocaron dos objetos idénticos en distinta posición (A1 y A2) y se dejó a la rata en el interior de la caja durante 3 minutos, contabilizándose el tiempo de exploración. Transcurridos los 3 minutos la rata se retiró de la caja de reconocimiento de objetos y se devolvió a su jaula de origen. Los objetos A1 y A2 también se retiraron de la caja.

#### Fase de reconocimiento:

20 minutos después de la fase de entrenamiento las ratas se retiraron individualmente de sus jaulas de origen y se regresaron a la arena de reconocimiento de objetos, donde dos

objetos nuevos (A3 y B) se fijaron al piso. El objeto A3 fue idéntico a los objetos A1 y A2, mientras que el objeto B difirió de los objetos A1, A2 y A3. De igual manera se anotaron el tiempo de exploración para ambos objetos. Después de 3 minutos la rata se retiró de la caja de reconocimiento de objetos y se devolvió a su jaula de origen.

Fase de reconocimiento corregida:

Transcurridas 24 horas después la prueba de reconocimiento se midió la memoria de largo plazo, para lo cual se cambiaron el objeto B por un nuevo objeto C y se siguió el mismo procedimiento. La arena se limpió con un paño húmedo que contuvo solución de hipoclorito de sodio y los objetos se limpiaron con etanol al 70% para eliminar señales de olor.



*Figura 9.* Arena de reconocimiento y objetos utilizados para la fase de reconocimiento.

La exploración de un objeto se definió cuando la rata dirigió su nariz hacia el objeto a una distancia menor de 2 cm. Se realizó una grabación de la fase de muestreo y elección y dos experimentadores evaluaron de forma independiente el tiempo que cada rata exploró cada uno de los objetos durante la muestra y las fases de elección.

La discriminación se calculó dividiendo la cantidad de exploración del objeto nuevo entre la cantidad total de exploración de dos objetos (el familiar y el novedoso). El tiempo de exploración se expresó como la media  $\pm$  la desviación estándar. Para la sesión de adquisición, el índice de reconocimiento (IR) se calculó como (tiempo explorando uno de los objetos/tiempo explorando ambos objetos) x100. Para la sesión de reconocimiento, el IR se calculó como (tiempo explorando el nuevo objeto/el tiempo explorando tanto el objeto familiar y novedoso) x 100.

Las variables que a cuantificar se tomaron como un indicador de memoria en las ratas a las expuestas a estas dos tareas conductuales. Los videos fueron vistos por dos observadores previamente entrenados, obteniéndose un índice de concordancia de 0.93 en promedio para el LB y de 0.90 para la prueba de NOR.

- **Medición de biomarcadores de inflamación**

En este trabajo se realizó la medición de biomarcadores inflamatorios. Por lo cual, la estrategia metodológica consistió en realizar dos mediciones clave: en primer lugar, la cuantificación de CRP en plasma fungió como control positivo para la inflamación, ya que ha demostrado ser un marcador muy sensible ante eventos inflamatorios (Wärnberg, Romero et al., 2011); por otra parte, se eligió realizar la medición de TNF $\alpha$  ya que, el aumento en la concentración de esta citocina contribuye a la presencia de déficits en el aprendizaje y memoria dependiente de hipocampo. En ambos casos se utilizó el kit ELISA de la marca ALPCO (Figura 10), así como el suero sanguíneo previamente obtenido.

Para el cálculo de ambos resultados, se realizó una curva a partir de los calibradores con la concentración conocidas de CRP y TNF $\alpha$ . El estándar cero fue usado como blanco con

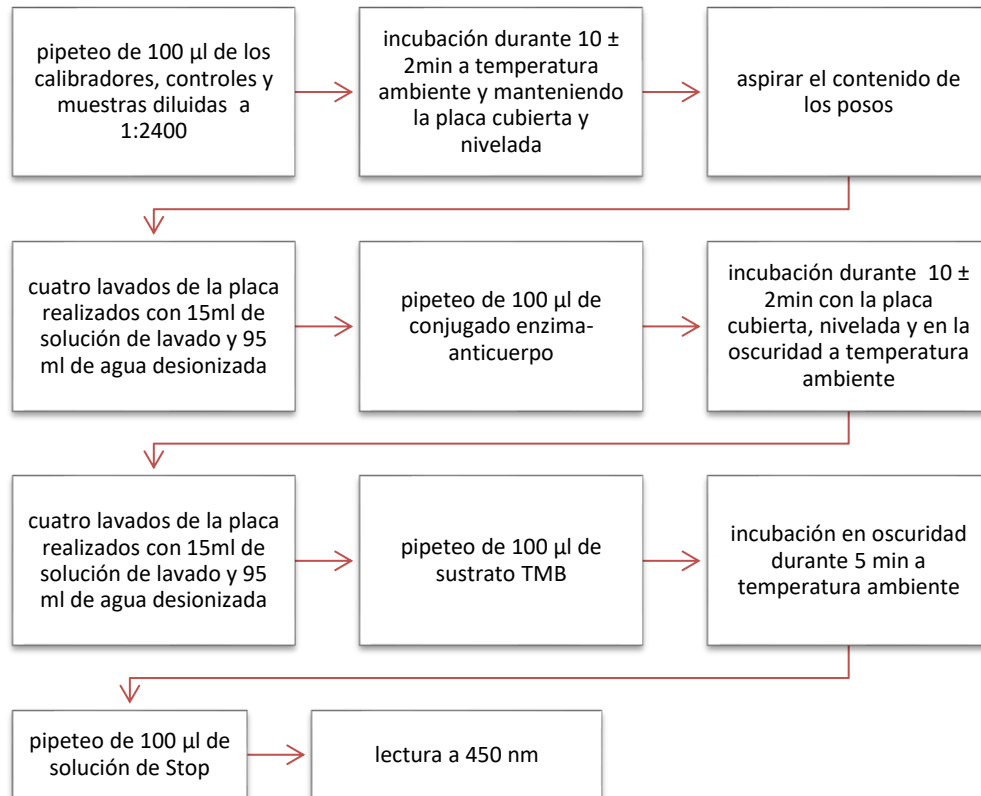
su valor medio restado de cada pocillo y con ayuda de un programa de software (Graphpad prism 6) se calculó la curva estándar y la determinación de la concentración de las muestras



*Figura 10.* Placa de ELISA utilizada para la medición de citocinas.

El procedimiento para la cuantificación de CRP se llevó a cabo conforme al manual adjunto del kit (ALPCO, 2017) (Figura 11).





*Figura 11.* Resumen del protocolo utilizado de acuerdo con el manual adjunto del kit ELISA de la marca ALPCO para la medición cuantitativa de CRP en rata.

De igual manera, el procedimiento para la cuantificación de TNF $\alpha$  se llevó a cabo conforme al manual adjunto del kit (ALPCO, 2016) (Figura 12).

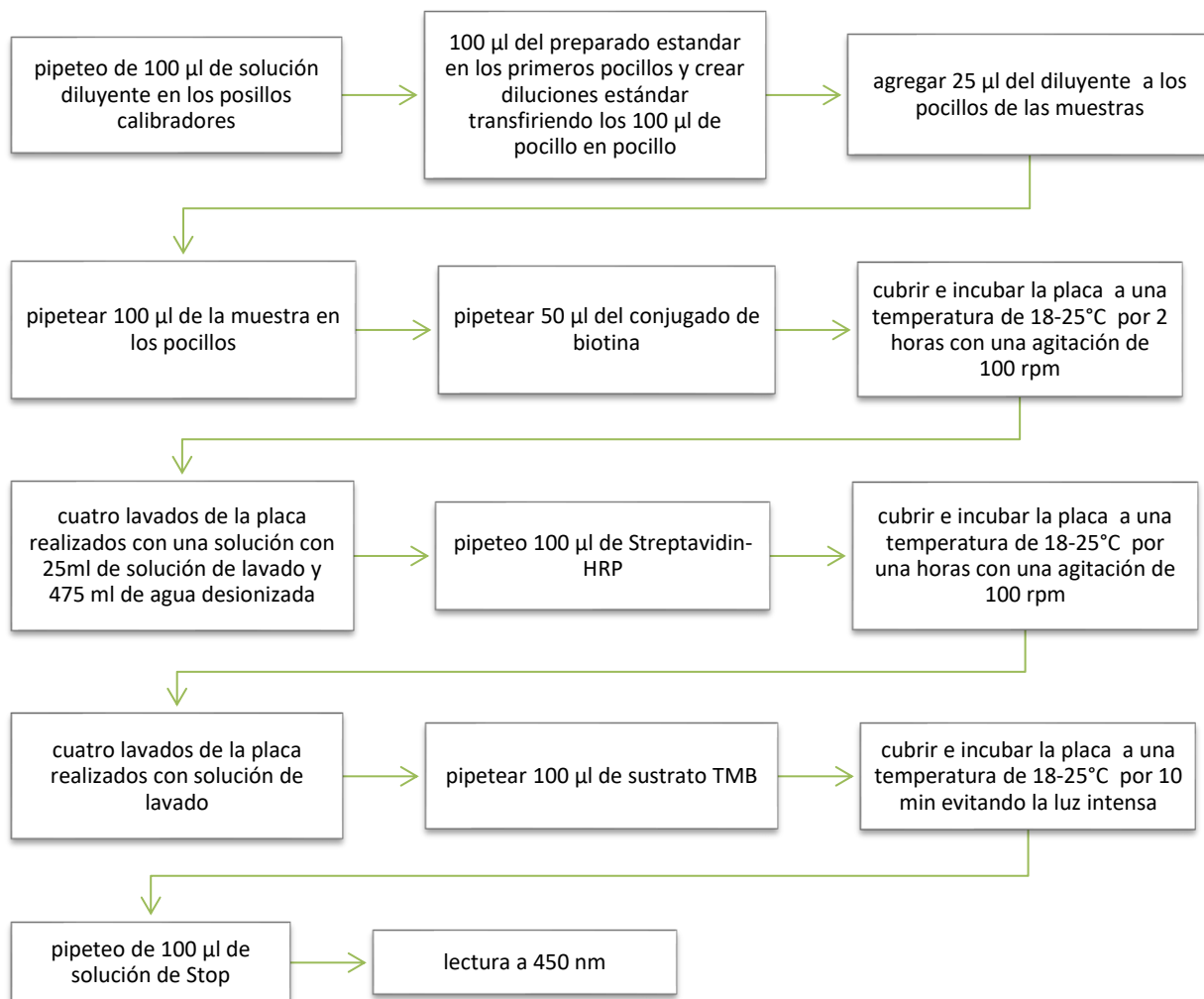


Figura 12. Resumen del protocolo descrito en el manual adjunto del kit ELISA de la marca ALPCO para la medición cuantitativa de TNF $\alpha$  en rata.

#### Análisis estadístico:

Para describir las características de la muestra se reporta medidas de tendencia central (media, mediana), así como el error estándar. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para probar el supuesto de normalidad y se evaluó la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. En caso de que se cumplieran los supuestos, se realizaron pruebas paramétricas: Análisis de varianza (ANOVA) de un factor, ANOVA de dos factores, ANOVA de dos

factores con medidas repetidas, las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Bonferroni y la prueba t de muestras independientes; En caso de no cumplirse los supuestos se utilizó la prueba U de Mann–Whitney y se realizó una correlación de Pearson. El valor de significancia que se utilizó fue  $p < 0.05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico desarrollado por IBM: SPSS versión 24, mientras que las gráficas fueron diseñadas en el programa GraphPad Prism versión 6.1.

## **VII. RESULTADOS**

En el presente estudio, la sección de resultados fue dividida en dos partes. La primera parte comprende los resultados obtenidos en los parámetros físicos y pruebas metabólicas, con el objetivo de corroborar la presencia de indicadores de SM, así como la medición de citocinas inflamatorias con la finalidad de confirmar el estado de inflamación crónica de bajo grado en las ratas tratadas con una dieta de sacarosa al 20% (p/v) en el agua de beber.

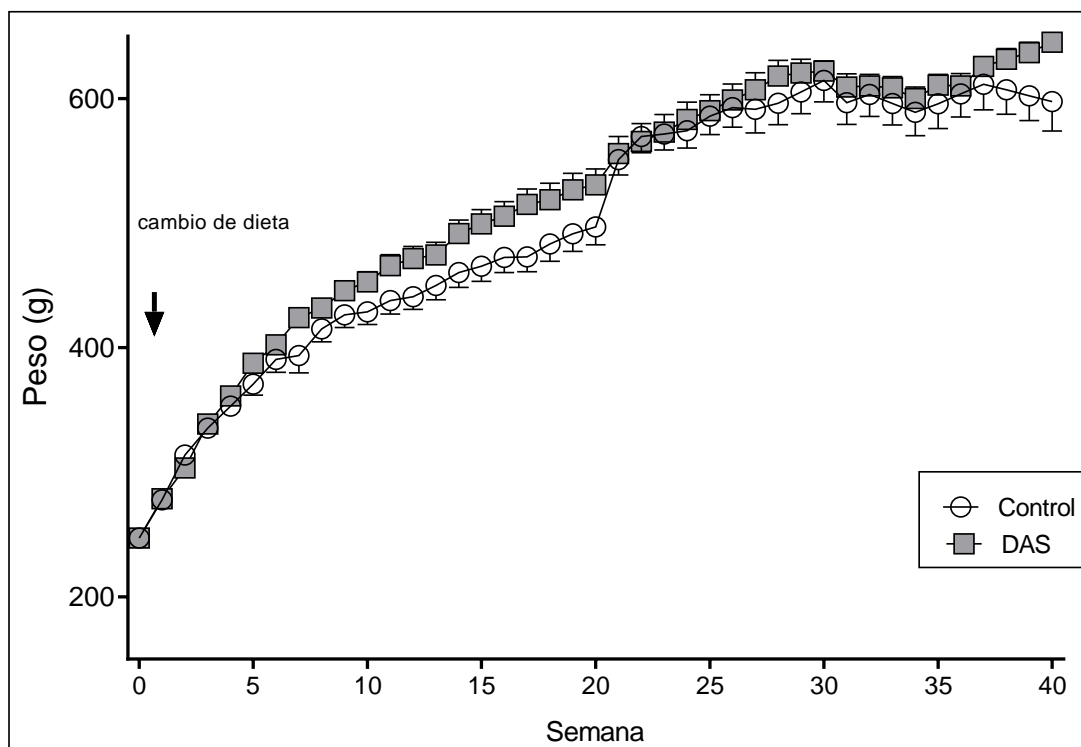
Una vez comprobadas las repercusiones metabólicas, se exploró la presencia de alteraciones conductuales en las ratas tratadas, siendo el principal foco de atención la memoria de reconocimiento y visuoespacial, lo cual comprende la segunda parte de los resultados.

Primera parte: cambios metabólicos.

### Peso Corporal:

Para conocer si la dieta influyó en el desarrollo de la obesidad, el peso corporal de ambos grupos fue medido semanalmente, a partir de las ocho semanas de edad. Las ratas del grupo control iniciaron con un peso promedio de  $246.16 \pm 3.53$  g, mientras que el grupo tratado inició con  $248.5 \pm 3.01$  g de peso. Las diferencias del peso a lo largo del estudio

fueron analizadas por medio de ANOVA de dos factores. Revelándose un efecto significativo en el factor tiempo ( $p < 0.05$ ), no así en el factor tratamiento ni en la interacción entre los factores tiempo-tratamiento ( $p > 0.05$ ), pues en ambos grupos se observa una evolución de peso similar (Gráfica 1).



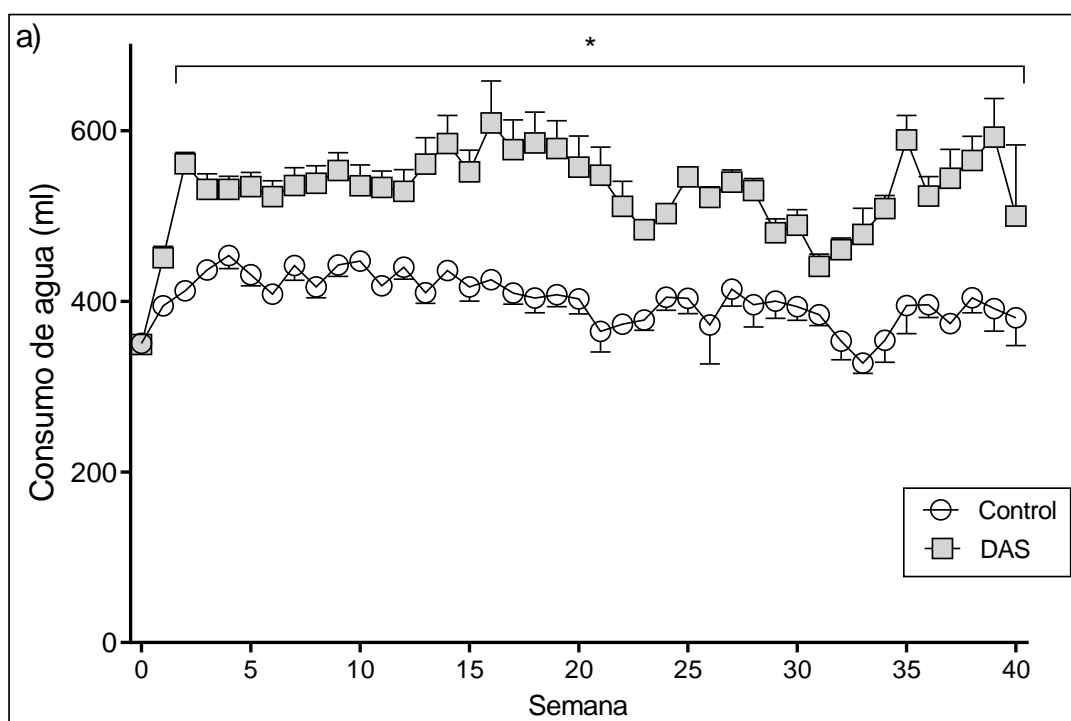
Gráfica 1. Evolución temporal de peso durante 40 semanas. Los datos representan el promedio  $\pm$  ES. Se representa el grupo control en círculos blancos  $n=19$  y el grupo DAS en cuadrados grises  $n=16$ , \*  $p < 0.05$ .

#### Consumo de agua y alimento:

Con la finalidad de corroborar si la dieta juega un papel importante en el aumento de peso se cuantificó el consumo semanal de alimento y de agua con sacarosa para cada sujeto a lo largo del estudio.

Referente al consumo de agua, ambos grupos mostraron un consumo similar en la semana previa a la implementación de la DAS el cual fue analizado con una prueba t de

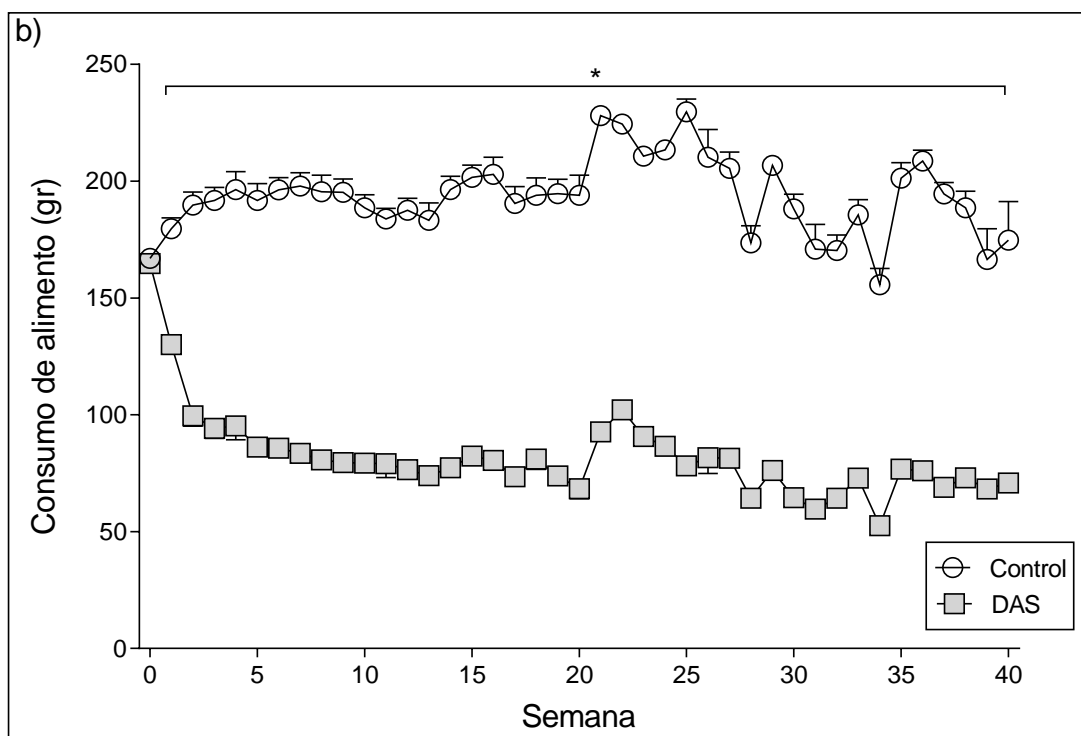
Student para muestras independientes sin revelar diferencias estadísticamente significativas ( $t_{(33)}=0.153$ ,  $p=0.879$ ). Una vez iniciada la manipulación de la dieta el grupo tratado mostro un consumo significativamente mayor en comparación con el grupo control. Estas diferencias fueron analizadas con un ANOVA de dos vías, el cual mostró un efecto significativo en función del tratamiento ( $F_{(1,40)}= 8.630$ ,  $p=0.006$ ) y en función del factor semana ( $F_{(2,19)}= 118.77$ ,  $p = 0.001$ ), mostrando de igual manera una interacción semana por grupo significativa ( $F_{(40,320)}= 3.084$ ,  $p= 0.035$ ). (Gráfica 2a).



Gráfica 2a. Consumo de agua por semana a lo largo del estudio. Los datos representan el promedio  $\pm$  ES. Se presenta el grupo control en círculos blancos  $n= 19$  y el grupo DAS en cuadrados grises  $n=16$ , \*  $p= <0.05$ .

En cuanto al consumo de alimento se observa una ingesta similar entre ambos grupos previo a la implementación de la dieta, la cual no mostró diferencias significativas ( $t_{(33)}= 0.511$ ,  $p= 0.613$ ). Sin embargo, a partir de la semana 1 y hasta el final del tratamiento, el

grupo control consumió significativamente más alimento en comparación con el tratado. Un ANOVA de dos vías indicó que existen un efecto significativo en el factor grupo  $F_{(1,16)}=797.207$ ,  $p=0.001$ , en función de las semanas  $F_{(40,240)}=21.048$ ,  $p=0.001$  y en la interacción de ambas  $F_{(40,240)}=8.926$ ,  $p=0.001$  (Gráfica 2b).



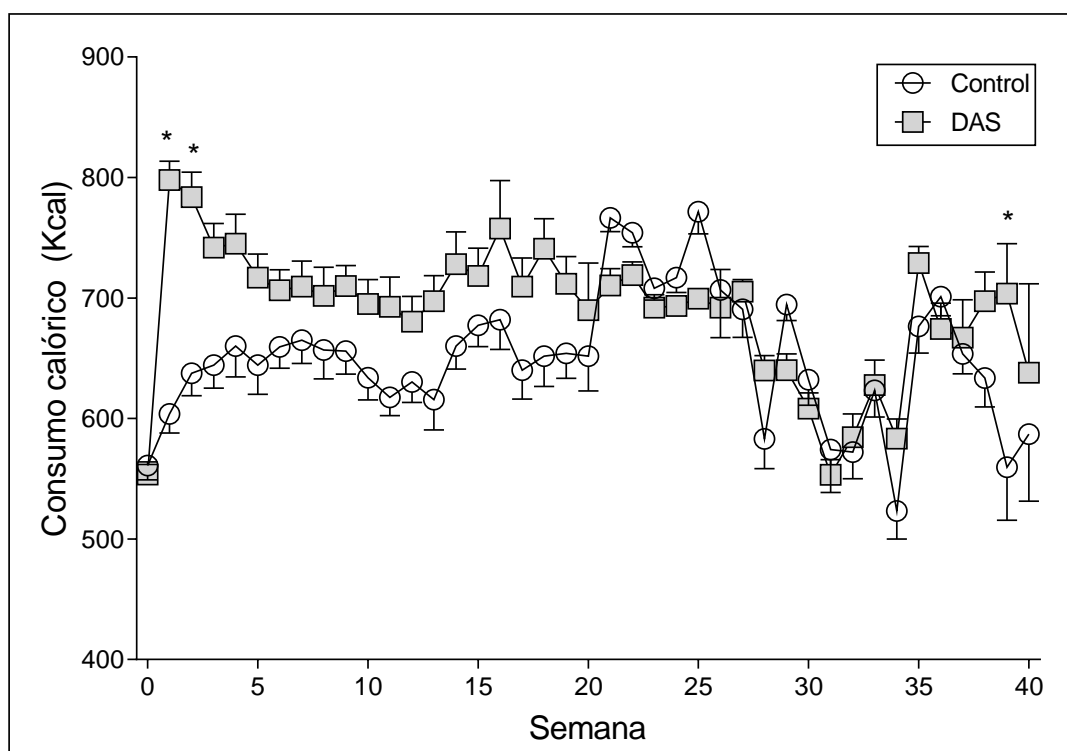
Gráfica 2b. Consumo semanal de alimento. Los datos representan el promedio  $\pm$  ES. Se presenta el grupo control en círculos blancos  $n=19$  y el grupo DAS en cuadrados grises  $n=16$ , \*  $p < 0.05$ .

### Consumo calórico:

Posteriormente se analizó el consumo calórico a lo largo del estudio para ambos grupos, el cálculo se hizo a partir de las calorías proporcionadas por la dieta chow para el grupo control, y para el grupo tratado además se sumaron las calorías aportadas por el agua con sacarosa. Nuevamente se verificó que el consumo calórico fuera similar en la semana

previa a la DAS con una prueba t de Student para muestras independientes  $t_{(33)} = 0.499$ ,  $p = 0.621$ ).

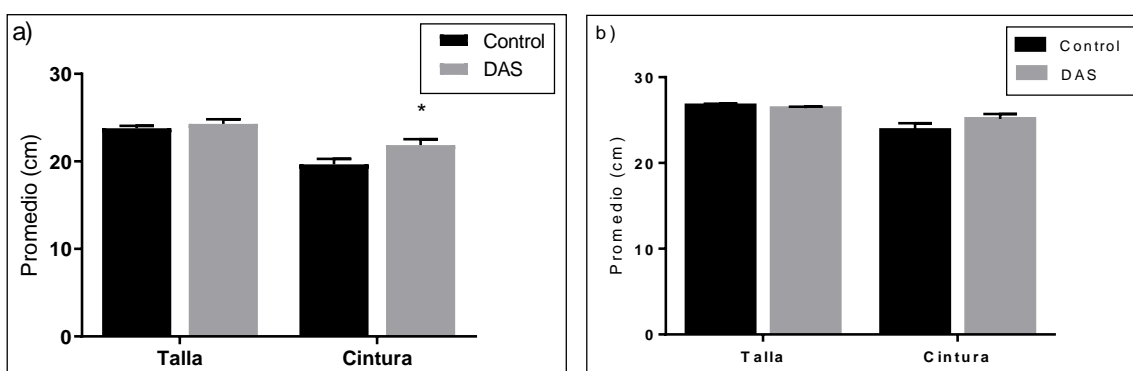
En cuanto a las semanas posteriores a la implementación de la dieta se observó por medio de un ANOVA de dos vías que no existió una diferencia significativa en el consumo calórico promedio entre grupos. Sin embargo, el análisis de comparaciones múltiples arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las semanas 2, 3 y 39 (Gráfica 3). Se observó un efecto significativo en el factor semanas ( $F_{(40,240)} = 13.64$ ,  $p = 0.001$ ).



Gráfica 3. Curso temporal del consumo calórico por semana durante el estudio. Los datos representan el promedio  $\pm$  ES. Se presenta el grupo control en círculos blancos  $n = 19$  y el grupo DAS en cuadrados grises  $n = 16$ , \*  $p < 0.05$ .

### Medida de talla y cintura:

Otro parámetro físico medido fue la talla y circunferencia abdominal (cintura), así como la composición corporal. Se observa en el punto de corte de 20 semanas un incremento en la medición de cintura del grupo DAS=  $21.86 \pm 1.77$  con respecto a la de los controles=  $19.67 \pm 1.87$ , esta diferencia fue analizada con una prueba t de Student para muestras independientes encontrándola estadísticamente significativa  $t_{(14)} = -2.376$ ,  $p = 0.032$ . Sin embargo, no se revelaron diferencias significativas en el parámetro talla a las 20, mientras que a las 40 semanas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros cintura y talla ( $p > 0.05$ ) (Gráfica 4).



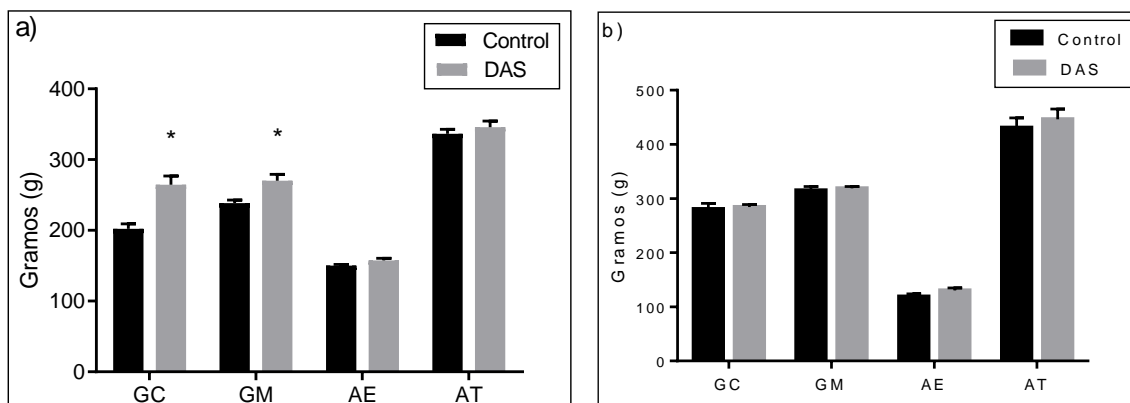
Gráfica 4. Medición de talla y abdomen (cintura) en cm. a) Media ± ES en el grupo de 20 semanas. b) Media ± ES en el grupo de 40 semanas. Para ambos grupos se representa gráfico el grupo control n= 9 con barras negras y el grupo DAS n= 7, \* p < 0.05.

### Composición corporal:

Las diferencias en la composición corporal fueron analizadas por medio de una prueba t de Student para muestras independientes, observándose que el grupo tratado presentó un aumento estadísticamente significativo en el valor de grasa corporal ( $t_{(14)} = 4.59$ ,  $p < 0.001$ ) y masa magra ( $t_{(14)} = 3.45$ ,  $p = 0.004$ ), pero no en las variables de agua extracelular



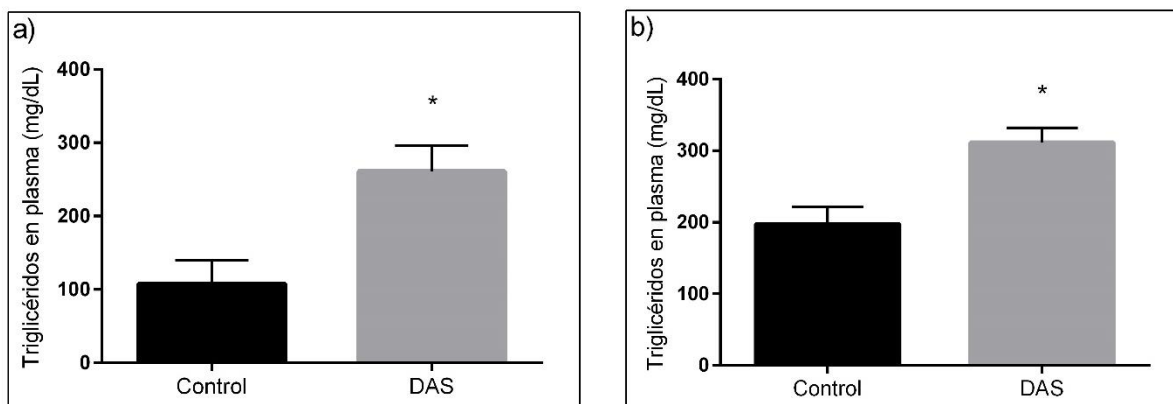
y agua total para el punto de corte de 20 semanas. Mientras que a las 40 semanas no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los valores mencionados (Gráfica 5).



Gráfica 5. Composición corporal medida en gramos. a) Se graficó la media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas. b) media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. (GC) grasa corporal, (GM) grasa magra, (AE) agua extracelular, (AT) agua total. Para ambos puntos de corte se representa el grupo control n= 9 con barras negras y el grupo DAS n= 7, \* p < 0.05.

### Medición de Triglicéridos:

La hipertrigliceridemia es otra manifestación que presentan los sujetos que padecen SM, por lo que se decidió analizar si los grupos ocupados en este estudio presentaban alterados los niveles en sangre de triglicéridos. Esta diferencia fue analizada con una prueba t de Student para muestras independientes, la cual mostró un incremento significativo a las 20 semanas en los sujetos del grupo DAS ( $t_{(14)}= 4.64$ ,  $p= 0.001$ ). Véase Gráfica 6a. Mientras que a las 40 semanas se sigue el mismo patrón donde el grupo DAS presenta valores más elevados en comparación con el grupo control y cuya diferencia es estadísticamente significativa ( $t_{(14)}= 3.461$ ,  $p= 0.004$ ) (Gráfica 6b).



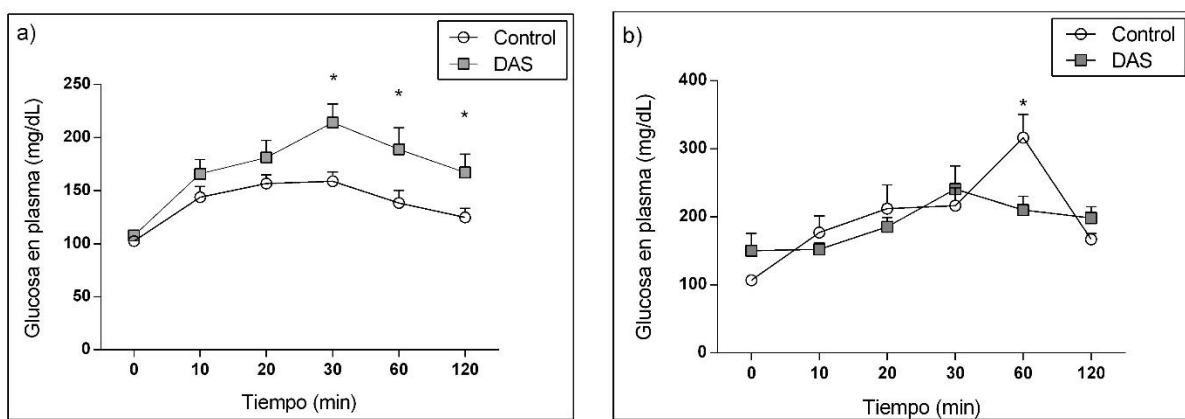
Gráfica 6. Medición de triglicéridos. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. Para ambos puntos de corte se representa el grupo control n= 9 con barras negras y el grupo DAS n= 7 con barras grises, \* p < 0.05.

#### Curva de tolerancia a la glucosa:

Otra medición metabólica realizada fue la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. Las ratas tuvieron un ayuno previo a la prueba de 12 horas y se registraron los valores basales y hasta los 120 minutos después de ser administrada una carga de glucosa intraperitoneal.

Para el punto de corte de 20 semanas la curva de ambos grupos presentó el máximo punto glucémico a los 30 minutos posterior a la administración de glucosa y que continuaron con una disminución gradual hasta los 120 minutos. Se realizó un ANOVA de dos vías con medidas repetidas para determinar las diferencias a lo largo de la curva, el cual reveló la presencia de un efecto en el factor grupo  $F_{(1,5)} = 7.427$ ,  $p = 0.042$  y en el factor tiempo  $F_{(5,25)} = 12.430$ ,  $p < 0.001$ , no así en la interacción de ambos ( $p > 0.05$ ). A través del análisis de comparaciones múltiples se encontraron diferencias en los puntos correspondientes a los 30 ( $p = 0.02$ ), 60 ( $p = 0.041$ ) y 120 minutos ( $p = 0.033$ ), véase Gráfica 7a.

Mientras que para el punto de corte de 40 semanas se observa el punto máximo glucémico a los 60 minutos para las ratas control y a los 30 minutos para el grupo tratado. Las diferencias entre ambos grupos fueron analizadas por medio de un ANOVA de dos vías, obteniendo un efecto en el factor tiempo  $F_{(2,540,15,241)} = 8.12$ ,  $p = 0.003$  no así en el factor grupo ni en la interacción entre ambos ( $p > 0.05$ ). Las comparaciones múltiples revelaron diferencias significativas en a los 60 ( $p = 0.038$ ) y 120 minutos ( $p = 0.048$ ) (Gráfica 7b).

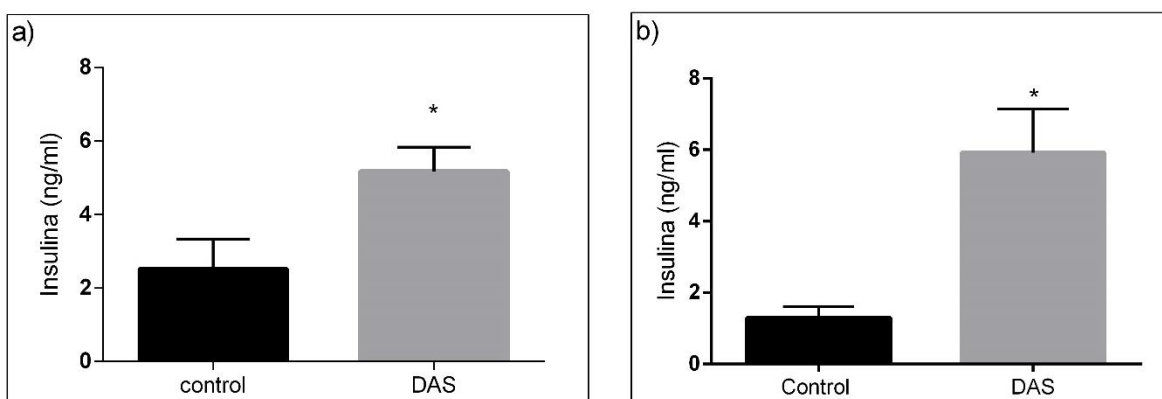


Gráfica 7. Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. Ambas graficas muestran los niveles de glucosa en sangre del minuto cero que es antes de la carga de glucosa y hasta los 120 minutos después de la misma. Para ambos puntos de corte se representa el grupo control  $n = 9$  con círculos blancos y el grupo DAS  $n = 7$  con cuadrados grises, \*  $p < 0.05$ .

### Medición de Insulina:

La insulina es una hormona estrechamente relacionada con la regulación en los niveles de glucosa, por lo que una curva de tolerancia alterada sugiere la existencia de un cambio en la secreción normal de insulina. Por ello se analizaron los niveles en sangre de insulina para los dos grupos, así como en los dos puntos de corte. Se puede observar que el grupo tratado con sacarosa a las 20 ( $5.17 \pm 0.65$  ng/ml) y 40 semanas ( $5.91 \pm 1.23$  ng/ml)

tienen niveles mayores en comparación con el grupo control de 20 ( $2.51 \pm 0.81$  ng/ml) y de 40 semanas ( $1.29 \pm 0.31$  ng/ml). Estas diferencias se analizaron con las pruebas t de Student para muestras independientes las cuales resultaron ser significativas a las 20 ( $t_{(14)}= 2.50$ ,  $p= 0.027$ ) y a las 40 semanas ( $t_{(14)}= 4.07$ ,  $p= 0.001$ ) (Gráfica 8).

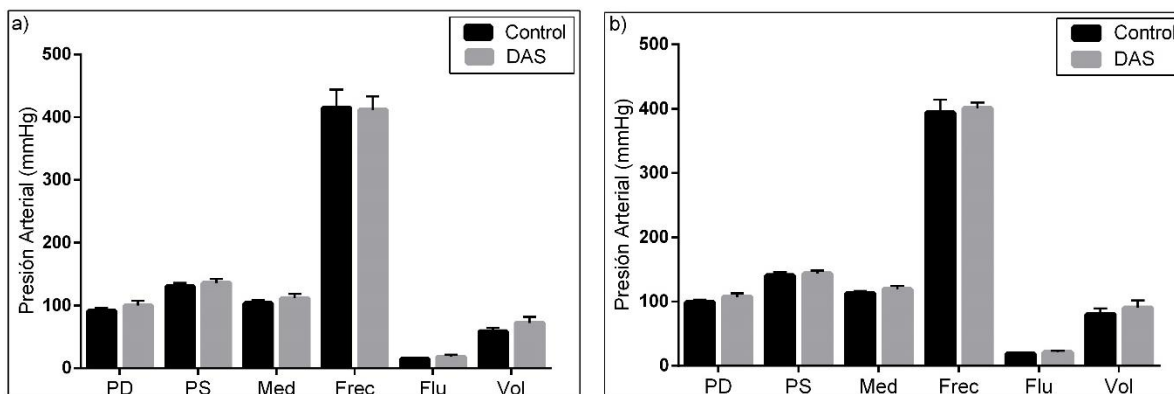


Gráfica 8. Medición de Insulina. a) Media ± ES del grupo de 20 semanas, b) Media ± ES del grupo de 40 semanas. Ambas graficas muestran los niveles de Insulina en sangre. Para los dos puntos de corte se representa el grupo control n= 9 con barras negras y el grupo DAS n= 7 con barras grises, \* p < 0.05.

### Presión Arterial:

Tomando en cuenta que la hipertensión arterial está presente en el SM, se evaluó la existencia de este signo en las ratas que recibieron la dieta alta en sacarosa. Por lo cual los sujetos fueron habituados durante cinco días en un inmovilizador para evitar que el estrés provocado por el instrumento de medición alterara los resultados. Se observa que a las 20 semanas las ratas tratadas muestran resultados ligeramente más altos en marcadores como presión diastólica, presión sistólica, media, flujo y volumen, así como las ratas control muestran un ligero aumento en la frecuencia. Estas diferencias fueron analizadas por medio de una prueba t de Student para muestras independientes para cada parámetro registrado sin revelar diferencias significativas entre estos parámetros. Mientras que a las 40 semanas las

ratas tratadas siguen mostrando valores ligeramente mayores en todos los parámetros previamente señalados sin ser significativos (Gráfica 9).



Gráfica 9. Medición de Presión Arterial. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. En ambos casos los valores se presentan en unidades de milímetros de mercurio (mmHg). PD: Presión Diastólica. PS: Presión Sistólica. Med: Media. Frec: Frecuencia. Flu: Flujo. Vol: Volumen. Para ambos puntos de corte se representa al grupo control (n= 6, 20 semanas y n= 10, 40 semanas) con barras negras y el grupo DAS (n= 6, 20 semanas y n= 10, 40 semanas) con barras grises.

### Medición de marcadores de inflamación:

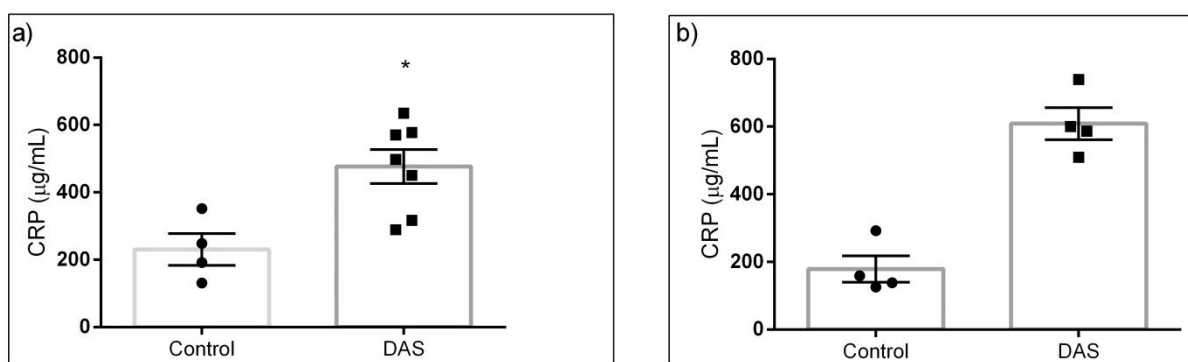
Con la finalidad de confirmar la presencia inflamación crónica de bajo grado en las ratas tratadas con sacarosa se realizó la medición cuantitativa de CRP a partir del suero sanguíneo como control positivo.

#### ○ CRP

El primer marcador de inflamación que se midió es la CRP. Se aprecia que a las 20 semanas las ratas tratadas presentan niveles mayores de CRP ( $476.64 \pm 50.22 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación con el grupo control ( $224.77 \pm 65.81 \mu\text{g/mL}$ ). Estos valores fueron analizados

por una prueba t de Student para muestras independientes, la cual mostró diferencias significativas ( $t_{(10)} = -2.84$ ,  $p = 0.002$ ).

Por otra parte, a las 40 semanas el grupo tratado con sacarosa sigue mostrando niveles mayores de CRP ( $611.66 \pm 67.45 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación con el grupo control ( $344.98 \pm 168.66 \mu\text{g/mL}$ ), sin embargo, a las 40 semanas no se revelaron diferencias significativas (Gráfica 10).



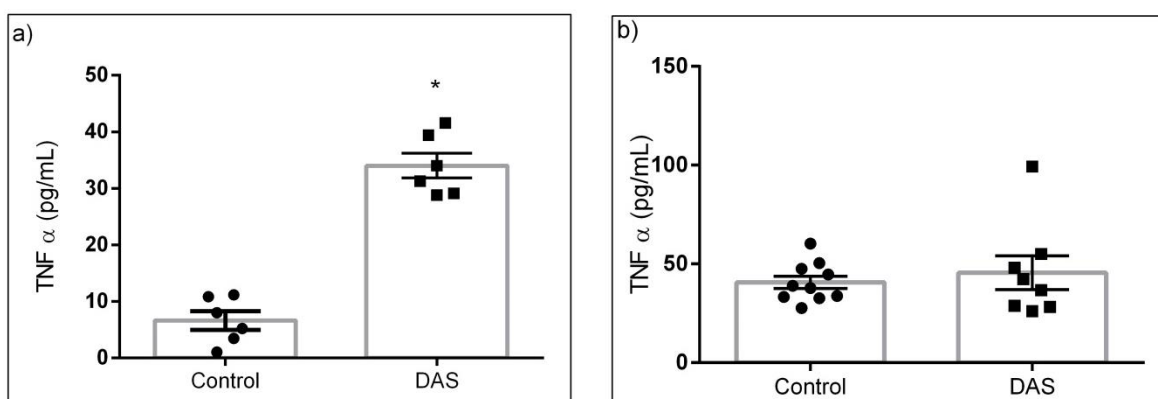
Gráfica 10. Medición de CRP. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. Para ambos puntos de corte los valores se presentan en unidades de microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ). En las dos gráficas representa al grupo DAS ( $n=7$ , 20 semanas y  $n=4$ , 40 semanas) con barras grises y el grupo control ( $n=4$ , 20 semanas y  $n=5$ , 40 semanas) con barras blancas. \*  $p < 0.05$ .

## TNF $\alpha$

Posteriormente se cuantificó la concentración de TNF $\alpha$  en suero sanguíneo como un indicador más orientado a evidenciar la presencia de alteraciones cognitivas.

Se observa que a las 20 semanas el grupo DAS presenta mayores niveles de TNF $\alpha$  ( $34.04 \pm 2.19 \text{ pg/mL}$ ) en comparación con el grupo control ( $6.64 \pm 1.67 \text{ pg/mL}$ ). De igual manera a las 40 semanas el grupo tratado presenta niveles ligeramente mayores ( $41.94 \pm 5.61 \text{ pg/mL}$ ) en comparación con el grupo control ( $38.59 \pm 3.30 \text{ pg/mL}$ ). Ambos puntos de corte

no revelaron diferencias significativas con la prueba t de Student. Estas diferencias fueron analizadas por medio de una prueba U de Mann Whitney ( $U= 36$ ,  $p= 0.002$ ) revelando diferencias estadísticamente significativas a las 20 semanas, no así a las 40 semanas (Gráfica 11).



Gráfica 11. Medición de TNF $\alpha$ . a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. Para ambos casos los valores se presentan en unidades de picogramos por mililitro (pg/mL). En ambos puntos de corte se representa al grupo DAS ( $n=6$ , 20 semanas y  $n=6$ , 40 semanas) con barras grises y el grupo control ( $n=6$ , 20 semanas y  $n=7$ , 40 semanas) con barras blancas. \*  $p < 0.05$ .

En resumen, el grupo tratado con DAS fue significativamente diferente al grupo control en los parámetros que caracterizan el SM como lo es obesidad central (peso, grasa y circunferencia abdominal), curva de tolerancia a la glucosa alterada, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia) así como un aumento en los marcadores de inflamación periférica, lo cual podría indicar un estado de inflamación crónica de bajo grado.

Segunda parte: alteraciones cognitivas.

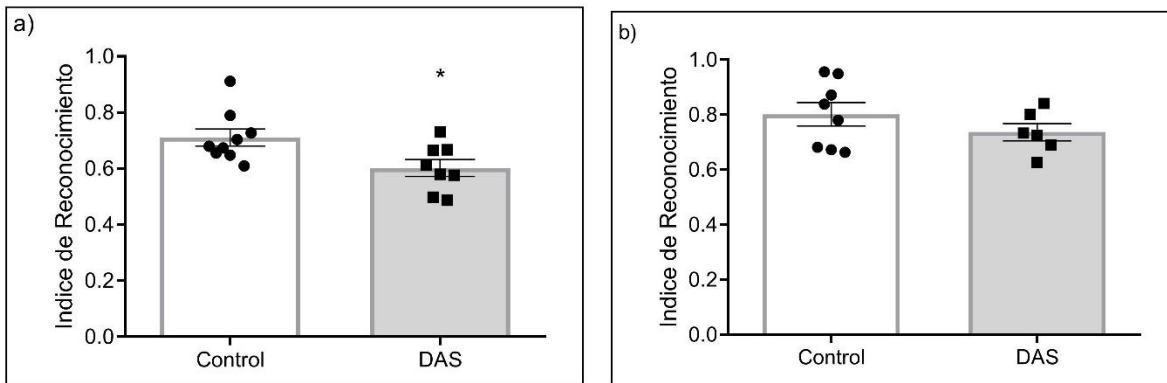
Una vez comprobado que el grupo al que se le administró una DAS presenta alteraciones propias del SM y cuenta con alteración en los niveles de citocinas inflamatorias, se evaluó la memoria de reconocimiento y visuoespacial en ambos puntos de corte y se analizaron las curvas de aprendizaje de cada grupo.

Memoria de reconocimiento:

Se evaluó la memoria de reconocimiento con la prueba de reconocimiento de objetos novedosos en la semana 15 y 35 de tratamiento. En ambos casos, se evaluó el índice de reconocimiento a los 30 min y 24 horas posteriores a la fase de familiarización, el cual evalúa la preferencia para explorar los objetos que le resulten novedosos a los sujetos de experimentación a partir de la medición del tiempo que invierten los sujetos experimentales explorando los objetos familiares y novedoso.

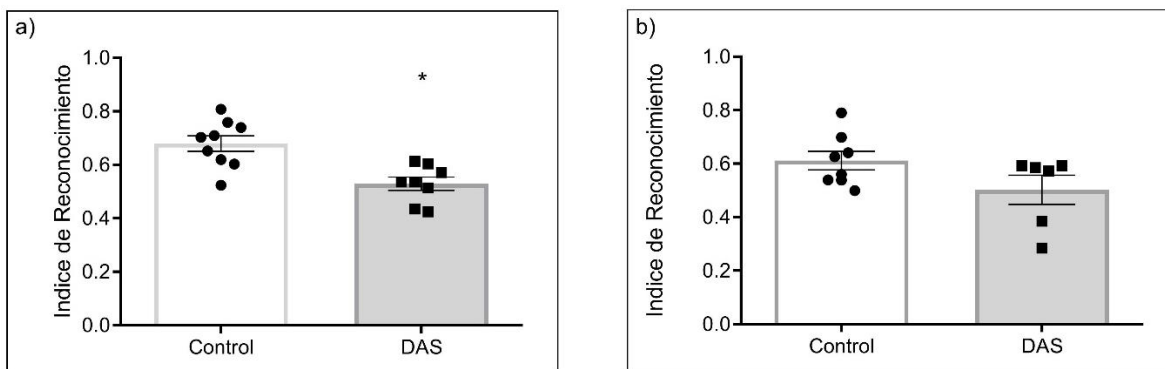
Los datos obtenidos muestran que, en la primera fase de prueba, realizada a los 30 minutos posteriores a la familiarización en ambos puntos de corte el grupo control presenta mayor preferencia al objeto novedoso en comparación con el grupo tratado. Dicha diferencia fue analizada por medio de la prueba t de Student para muestras independientes donde se revelaron diferencias significativas para a las 20 semanas  $t_{(15)}= 2.542$ ,  $p= 0.002$ ), no así a las 40 semanas  $t_{(12)}= 1.154$ ,  $p= 0.271$  (Gráfica 12).





Gráfica 12. Índice de reconocimiento. Los datos representan la preferencia a explorar el objeto novedoso pasados 30 minutos después de la fase de familiarización. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. En las dos gráficas representa al grupo DAS (n=8, 20 semanas y n=6, 40 semanas) con barras grises y el grupo control (n=9, 20 semanas y n=8, 40 semanas) con barras blancas. \*  $p < 0.05$ .

La segunda fase de prueba se realizó 24 horas después de realizada la familiarización de objetos. Nuevamente se le presentó a los sujetos un objeto novedoso y se midió el tiempo que gastaban explorando ambos objetos para posteriormente calcular el índice de reconocimiento. Se observa que, nuevamente para ambos puntos de corte el grupo control muestra mayor preferencia para explorar el objeto novedoso en comparación con el grupo de DAS. Dicha diferencia fue significativa solo a las 20 semanas  $t_{(15)} = 3.85$ ,  $p = 0.002$  (Gráfica 13).



*Grafica 13.* Índice de reconocimiento. Los datos representan la preferencia a explorar el objeto novedoso pasadas 24 horas de la fase de familiarización. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. En las dos gráficas representa al grupo DAS (n=8, 20 semanas y n=6, 40 semanas) con barras grises y el grupo control (n=9, 20 semanas y n=8, 40 semanas) con barras blancas. \*  $p < 0.05$ .

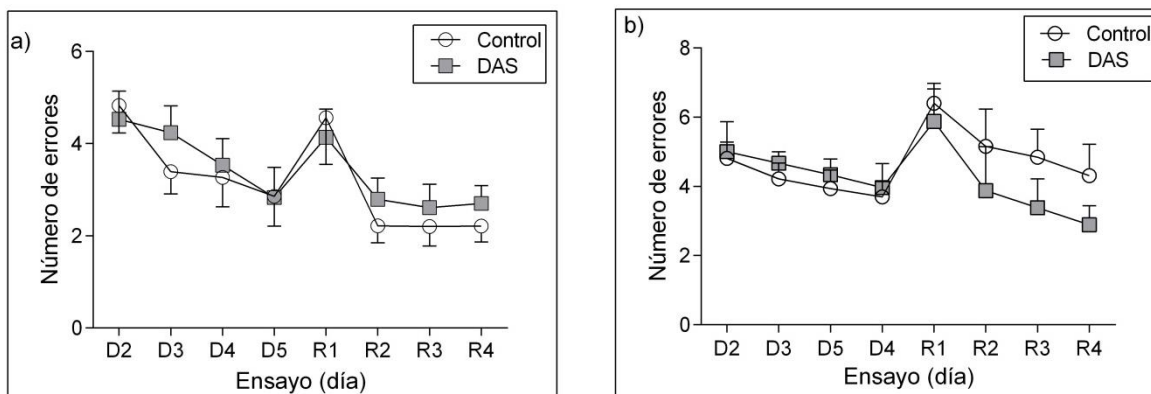
### Memoria visuoespacial:

Posterior a la medición de memoria de reconocimiento se aplicó el LB para evaluar la memoria visuoespacial a las 17 y 37 semanas de tratamiento. Para ello se cuantificaron dos parámetros (errores y latencia) y se analizaron las curvas de aprendizaje.

Errores: son aquellos errores que se cometieron antes de encontrar por primera vez el agujero de escape durante cada ensayo. Para las 20 semanas, se obtuvo que al inicio de la fase de adquisición las del grupo tratado obtuvieron un promedio de errores ( $4.53 \pm 0.61$ ) similar al del grupo control ( $4.83 \pm 0.60$ ). Asimismo, a lo largo de esta fase se observa una reducción en el número de errores cometidos en ambos grupos, para finalizar en un promedio de errores nuevamente similar para el grupo tratado ( $2.83 \pm 0.65$ ) y el grupo control ( $2.86 \pm 0.65$ ). Mientras que en la fase de reversión se obtuvieron resultados similares en el grupo tratado ( $4.14 \pm 0.61$ ) y el control ( $4.56 \pm 1.01$ ) al inicio y al final ( $2.70 \pm .39$ ,  $2.21 \pm 0.35$ ) respectivamente. Estos resultados fueron analizados con un ANOVA de dos vías cuyos

resultados fueron significativos para el factor ensayo  $F_{(4.26, 29.88)} = 3.788$ ,  $p = 0.012$ , sin embargo, el factor grupo y la interacción entre ambos no fue significativa ( $p > 0.05$ ).

Por otra parte, a las 40 semanas se observa nuevamente que al inicio de la adquisición el promedio de errores es similar para el grupo control ( $4.81 \pm 0.47$ ) y tratado ( $5 \pm 0.87$ ), los cuales disminuyeron paulatinamente hasta terminar en  $3.70 \pm 0.49$  y  $3.96 \pm 0.70$  en el grupo control y tratado respectivamente. Para el periodo de reversión se observa el grupo control presenta  $6.40 \pm 0.41$  errores al inicio y  $4.31 \pm 0.55$  al final; por otra parte, el grupo tratado en esta fase presenta  $5.87 \pm 1.09$  y  $2.89 \pm 0.55$  errores al inicio y al final respectivamente. El ANOVA para este punto de corte no arrojó resultados significativos para los factores grupo, ensayos, ni en la interacción entre ambos (Gráfica 14).

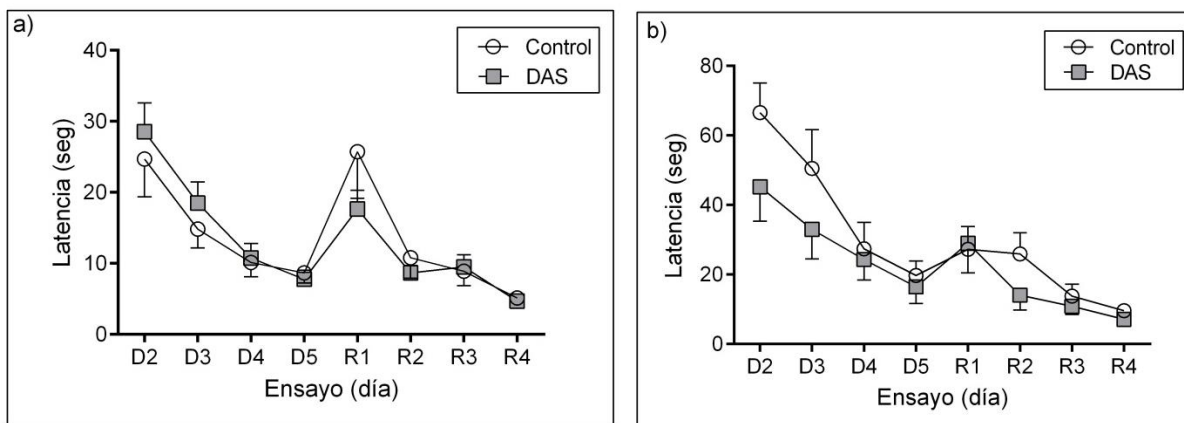


*Gráfica 14.* Errores. Los datos representan la curva de aprendizaje con el número de errores a lo largo de los ensayos de la prueba Laberinto de Barnes. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. En las dos gráficas representa al grupo DAS ( $n=8$ , 20 semanas y  $n=6$ , 40 semanas) con cuadrados grises y el grupo control ( $n=9$ , 20 semanas y  $n=8$ , 40 semanas) con círculos blancos.

Latencia: fue el segundo indicador de aprendizaje y memoria utilizado en este paradigma, el cual se refiere al tiempo que las ratas utilizan para buscar el agujero de escape.

Para el punto de corte de 20 semanas se observa una tendencia por parte del grupo tratado a presentar una latencia promedio ligeramente mayor ( $5 \pm 0.87$ ) en comparación del grupo control ( $4.81 \pm 0.47$ ) al inicio de la adquisición, sin embargo, para el final de esta el resultado es similar para ambos grupos. En la fase de reversión ocurre lo contrario, al principio es el grupo control quien presenta una latencia superior ( $6.40 \pm 0.41$ ) al grupo tratado ( $5.87 \pm 1.10$ ) y posteriormente va disminuyendo hasta terminar en una latencia similar. El ANOVA para la latencia a las 20 semanas reveló un efecto significativo para el factor ensayo ( $F_{(3, 26)}=16.847$ ,  $p < 0.001$ ), no así para el factor grupo ni la interacción entre ambos.

A las 40 semanas se observa al inicio de la adquisición el grupo control presentó un promedio mayor ( $66.57 \pm 8.55$ ) en comparación del grupo tratado ( $45.25 \pm 9.94$ ), en ambos casos dicho resultado fue disminuyendo a lo largo de los ensayos para culminar esta fase en resultados equivalentes para ambos grupos. Por otra parte, en la fase de reversión los resultados fueron parecidos al inicio ( $27.26 \pm 6.49$  y  $28.96 \pm 8.54$ ) para el grupo control y tratado respectivamente, y fueron disminuyendo a lo largo de la fase. Un ANOVA de dos vías reveló resultados significativos solo para el factor ensayo ( $F_{(3,20)}= 16.632$ ,  $p < 0.001$ ). Véase (Gráfica 15).



*Grafica 15.* Latencia. Los datos representan la curva de aprendizaje con la latencia de escape a lo largo de los ensayos de la prueba Laberinto de Barnes. a) Media  $\pm$  ES del grupo de 20 semanas, b) Media  $\pm$  ES del grupo de 40 semanas. En las dos gráficas representa al grupo DAS (n=8, 20 semanas y n=6, 40 semanas) con cuadrados grises y el grupo control (n=9, 20 semanas y n=8, 40 semanas) con círculos blancos blancas.

En este parámetro, ambos puntos de corte, los grupos presentaron una curva de aprendizaje evidenciada por la disminución del tiempo que invirtieron en la búsqueda del agujero de escape tanto en la fase de adquisición como en la de reversión. Se puede observar que los grupos de 40 semanas en general presentan una mayor latencia de escape en comparación con el grupo de 20 semanas. Esto puede deberse a la edad de las ratas.

MLP: esta evaluación se realizó con la finalidad de obtener un indicador de la retención de la ubicación espacial del agujero de escape, a través de la cuantificación de aciertos en un ensayo aislado, 72 horas posteriores al final de la habituación. En donde se considera una menor retención el obtener un menor número de aciertos y una mayor retención para un mayor número de aciertos.

Para los grupos de 20 semanas se obtuvo un 35% de aciertos para las ratas controles mientras que las tratadas presentaron un 38%. Por otra parte, a las 40 semanas ambos grupos presentaron un 41% de aciertos. Este resultado fue analizado con una prueba t de Student sin ser significativo en los dos puntos de corte.

Tiempo en el cuadrante correcto: De la misma manera, esta cuantificación es un indicador de retención de memoria a través de la medición del tiempo que la rata permanece en el cuadrante en el que previamente aprendió que se encontraba ubicado el agujero de escape.

En este indicador, encontramos que a las 20 semanas el grupo control presenta un tiempo de permanencia de  $44.28 \pm 6$  segundos en el cuadrante correcto mientras que para el grupo tratado el tiempo que invirtieron en este cuadrante fue de  $42.43 \pm 5$  segundos. Las diferencias se evaluaron con una prueba t de Student para muestras independientes sin ser significativas.

A las 40 semanas encontramos que, el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco para el grupo control fue de  $46.23 \pm 4$ , mientras que en el grupo control dicha latencia fue de  $47.91 \pm 7$ . Nuevamente no se encontraron diferencias significativas en este parámetro.

#### Correlación entre resultados conductuales y medición de biomarcadores de inflamación:

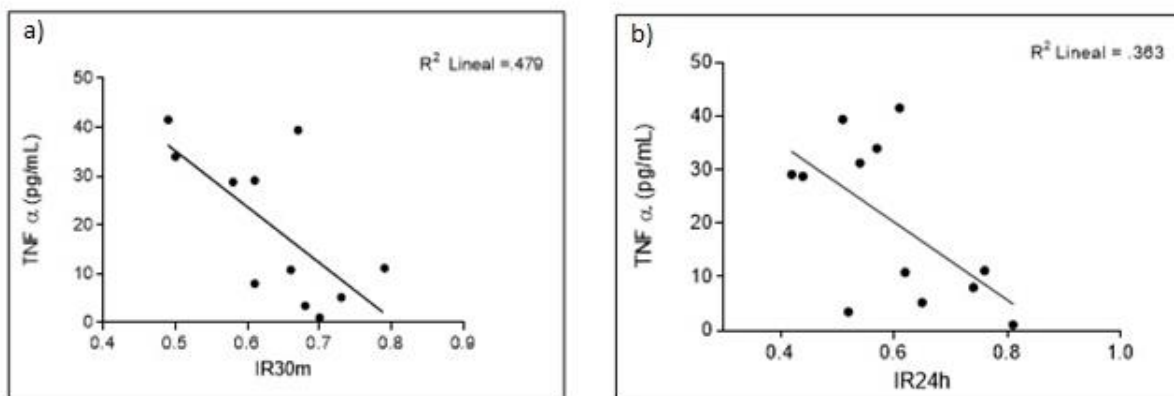
Finalmente, para determinar si existía una relación entre la concentración de marcadores de inflamación y el desempeño en las tareas de memoria, se realizó una correlación de Pearson entre los niveles de  $TNF\alpha$ , CRP y las variables conductuales obtenidas (Tabla1).

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON				
	MARCADOR	IR30m	IR24h	#ERRORES
20 SEMANAS	CRP	-0.392 (p=0.296)	-0.359 (p=0.308)	0.207 (p=0.567)
	TNF $\alpha$	<b>-0.692 (p=0.018)*</b>	<b>-0.603 (p=0.038)*</b>	0.179 (p=0.577)
40 SEMANAS	CRP	-0.786 (p=0.064)	-0.625 (p=0.134)	0.260 (p=0.534)
	TNF $\alpha$	-0.003 (p= 0.992)	0.045 (p=0.896)	-0.184 (p=0.555)

*Tabla 1.* Coeficiente de correlación de Pearson entre los niveles de CRP y TNF $\alpha$  y los índices de reconocimiento a los 30 minutos y 24 horas así como el aprendizaje (medido a través del número de errores del D5) para todos los grupos.

---

Se obtuvo un coeficiente de correlación significativo para las variables IR30m  $r = -0.692$  ( $p = 0.018$ ) e IR 24h  $r = -0.603$  ( $p = 0.038$ ), mientras que, para estas mismas variables se obtuvo un coeficiente de determinación para IR30m de  $R^2 = 0.479$  y para IR 24h fue  $R^2 = 0.363$ , lo cual indica que hay una correlación media para el IR 30 min y una correlación baja para el IR24h tomando en cuenta todos los grupos (Figura 16).



Grafica 16. Correlación entre la concentración de TNF $\alpha$  e IR en el grupo de 20 semanas. Diagrama de dispersión de la correlación entre la concentración de TNF $\alpha$  e IR. a) coeficiente de determinación entre los niveles de TNF  $\alpha$  e IR 30m, ( $r = -0.692$ ,  $p = 0.018$ ),  $R^2 = 0.479$ . b) coeficiente de determinación entre los niveles de TNF  $\alpha$  e IR24h min, ( $r = -0.603$ ,  $p = 0.038$ )  $R^2 = 0.363$ .

En resumen, los resultados conductuales muestran que las ratas del grupo DAS presentan una alteración en la memoria de reconocimiento a las 20 semanas de tratamiento, sin embargo, este resultado no se presenta a las 40 semanas de tratamiento. En cuanto a la memoria visuoespacial si bien se observan cambios de acuerdo a la edad de las ratas y al tiempo de tratamiento, no se encontraron alteraciones entre ambos grupos.

## VIII. DISCUSIÓN

La inflamación crónica de bajo grado es una condición presente en diversas enfermedades, entre ellas se encuentran los trastornos metabólicos como el SM (Ransohoff et al., 2015; Shabab et al., 2016; Hamasaki, Machado y Pinheiro da Silva, 2017) cuya incidencia ha ido aumentando en México y en el mundo (Peña et al., 2018), principalmente por la creciente ingesta de carbohidratos. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue



evaluar si existe una alteración en la memoria visuoespacial y la memoria de reconocimiento en ratas con inflamación crónica de bajo grado inducida por SM.

### **El SM como un desencadenante de la inflamación crónica de bajo grado.**

El SM es un conjunto de alteraciones metabólicas, constituido por la obesidad central, hipertrigliceridemia, hipertensión arterial, hiperglucemia, hiperinsulinemia y dislipidemia.

Con la finalidad de inducir inflamación crónica de bajo grado, se realizó la administración de una dieta alta en sacarosa en ratas como un modelo animal controlado de SM, a través del cual se observaron cambios en el consumo a lo largo del tratamiento pues las ratas tratadas presentaron una disminución en el consumo de alimento, así como un incremento en la cantidad de solución de sacarosa al 20% que bebían semanalmente. No se presentaron diferencias significativas en el consumo calórico total, peso, y talla en ambos puntos de corte, lo cual ha sido reportado anteriormente en estudios con este modelo, pero con diferente concentración de sacarosa (Soares et al., 2013; Lemos et al., 2016; Burgerio et al., 2017). Asimismo, a diferencia de lo que ha reportado anteriormente por Larqué et al. (2011) en este estudio no encontramos un efecto de la modificación a una DAS en los parámetros de presión arterial en ninguno de los puntos de corte utilizados, aunque se observa una tendencia por parte del grupo tratado a presentar promedios un poco más altos en comparación con el control.

De igual manera en otros parámetros como circunferencia abdominal, cantidad de grasa corporal y grasa magra, nivel de triglicéridos y de insulina en sangre, hemos encontrado diferencias entre los grupos para ambos puntos de corte, lo cual concuerda con los resultados arrojados en otros estudios (Long et al., 2017; Soares et al., 2013; Burgeiro et al., 2017;

Larqué et al., 2011; Gómez-Crisóstomo, 2018). En relación con la medición de tolerancia a la glucosa encontramos alteraciones a las 20 semanas a los 30, 60 y 120 minutos posteriores a la administración de solución de glucosa, dicho resultado es parecido al reportado anteriormente (Burgeiro et al., 2017; Larqué et al., 2011; Long; 2017), mientras que para las 40 semanas observamos alteración a los 60 y 120 minutos de la curva, así como un nivel basal de glucosa aumentado, aunque sin ser significativo. Dicho aumento en el nivel basal en estudios de larga duración con este modelo se ha sido observado anteriormente (Long et al., 2017). Estos resultados en conjunto muestran los cambios metabólicos que conforman el SM ya instalados en los grupos tratados.

En conjunto, se estudiaron diversas variables metabólicas, las cuales se sabe están alteradas en presencia del SM y en relación con la inflamación crónica de bajo grado (León Pedroza et al., 2015; Peña et al., 2018). En principio, el adipocito es la fuente principal de adipocinas asociadas a la inflamación, del mismo modo que la infiltración de tejido adiposo por macrófagos y células T (Wärnberg, Romero et al., 2011; Arisi, 2014; Calder et al., 2013; Lasselin y Capuron, 2014).

### **La medición de biomarcadores como indicadores de inflamación.**

Como se ha mencionado anteriormente, la inflamación es una condición estrechamente relacionada con alteraciones metabólicas como el SM. En este estudio se decidió utilizar como marcador de inflamación a la CRP en plasma, debido a su alta sensibilidad en la inflamación periférica (Wärnberg, Romero et al., 2011). Una vez confirmada la presencia de inflamación en las ratas tratadas, se procedió a la cuantificación de niveles en plasma sanguíneo de TNF $\alpha$  con la finalidad de corroborar si existe una relación

entre la elevación de esta citocina y la conducta medida a través de una tarea de memoria dependiente de hipocampo.

Los resultados muestran que tanto a las 20 como a las 40 semanas de tratamiento hay un aumento de TNF $\alpha$  a nivel periférico, mientras que para la CRP se encontró un aumento significativo a las 20 semanas de tratamiento lo cual concuerda con el aumento en la grasa corporal y circunferencia abdominal pues se sabe que a nivel periférico el tejido adiposo puede secretar estas citocinas proinflamatorias (Ramírez Alvarado y Sánchez Roitz, 2012; Wärnberg, Romero et al., 2011; Diné et al., 2011). En ambos grupos se observa un efecto de la edad; dicha variable corre de manera paralela y se ha reportado anteriormente que se asocia con el aumento de marcadores inflamatorios, principalmente TNF $\alpha$ , tanto en humanos como en modelos animales (Minihane et al., 2015).

Asimismo, es importante mencionar que otros estudios indican que a través de la modificación de la dieta se pueden limitar un pequeño número de marcadores sanguíneos de inflamación, los cuales se miden en un estado de ayuno, lo cual no necesariamente refleja la respuesta inflamatoria (Minihane et al., 2015).

Resumiendo hasta este punto, el aumento en los biomarcadores medidos nos indica la posible presencia de un estado inflamatorio crónico en los grupos tratados con DAS, lo cual podría afectar a nivel cognitivo. Esto debido a que la inflamación crónica de bajo grado provoca repercusiones sobre la barrera hematoencefálica y llevando así al tejido cerebral a un estado de neuroinflamación.

## **La inflamación crónica de bajo grado y las alteraciones en la memoria.**

Se ha sugerido que la función cerebral es susceptible a los efectos de la inflamación crónica de bajo grado, el cual puede derivar en deficiencias en los procesos cognitivos (Almeida-Suhett, Graham, Chen y Deuster, 2017). En este sentido, se ha propuesto que un estado inflamatorio crónico puede desencadenar una situación conocida como neuroinflamación, a través de un daño en la integridad de la barrera hematoencefálica, el cual involucra la activación de células gliales capaces de liberar citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Shabab et al., 2016).

Como se ha mencionado, las citocinas proinflamatorias presentes en el SNC desempeñan un papel importante en la plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP), la neurogénesis y la consolidación de la memoria, de manera que una alteración en la homeostasis por un aumento de éstas se ha asociado con el deterioro cognitivo (McAfoose y Baune, 2009). Por lo que se ha teorizado que podría haber una relación entre las alteraciones cognitivas y el incremento en la concentración de citocinas circulantes como CRP y TNF $\alpha$  y la inflamación (Dinel et al., 2011).

De acuerdo con los datos obtenidos en la prueba NOR se determinó que la capacidad de reconocer un objeto previamente conocido está alterada a las 20 semanas de tratamiento con DAS, tanto a los 30 minutos después a la familiarización como a las 24 horas posteriores. Esto resulta en un índice de correlación que, si bien no es una asociación relevante, se puede considerar como una correlación negativa media con TNF $\alpha$  cuya sobreexpresión se ha relacionado con alteraciones de la memoria dependiente de hipocampo (Belarbi et al., 2012).

A las 40 semanas no se observan diferencias en la ejecución de la prueba y adicionalmente se encontró que no existe una correlación entre los índices de discriminación obtenidos y la concentración de citocinas proinflamatorias. En un estudio realizado por Buyakata, Vukalo, Xu, Khore y Reichelt (2018), con una DAS al 10% por dos semanas no encontraron diferencias en el índice de discriminación con respecto del grupo control; del mismo modo se han reportado déficits en la memoria de reconocimiento en ratas con una DAS (35%) mayor de 9 semanas (Lemos et al., 2016; Soares et al., 2013). Sin embargo, no se cuenta con estudios previos que muestren alteraciones en este tipo de memoria para tiempos tan prolongados como se realizó en el presente estudio.

Estos datos son de gran interés ya que la correlación negativa obtenida para el IR-30m y TNF $\alpha$  podría ser un indicio de que este cambio se debe a una desregulación de esta citocina a nivel de SNC.

En cuanto a los resultados de memoria visuoespacial, estos indican un desempeño similar en el LB para ambos grupos; no se encontraron cambios significativos en la memoria visuoespacial a las 20 ni a las 40 semanas de tratamiento con DAS respecto de los grupos control. De igual manera no se encontró una correlación entre los niveles de citocinas estudiados y el desempeño en el LB, en contraste con investigaciones previas donde se encontraron deficiencias en memoria visuoespacial utilizando el LB, así como en el laberinto acuático de Morris, en ratas con DAS a diferentes concentraciones en tiempos cortos. Sin embargo, también se ha reportado que en estudios con un tratamiento mayor de 10 semanas no encuentran diferencias entre los grupos (Kendig, 2014). Por otra parte, se ha reportado una relación entre los niveles de la citocina interferón  $\gamma$ , y el déficit cognitivo evidenciado por un bajo rendimiento en la tarea del LB; en este estudio se utiliza al estrés crónico como desencadenante de una respuesta inflamatoria (Palumbo et al., 2018).

De acuerdo con las evidencias anteriores, se concluye que el SM provoca un aumento en la concentración de dos biomarcadores inflamatorios a nivel periférico, cuyos perfiles son sustancialmente distintos y que apoyan por un lado un estado general de inflamación (CRP), y por el otro, un estado de neuroinflamación (TNF $\alpha$ ) que orienta hacia una alteración central que puede estar afectando la memoria de reconocimiento en las ratas tratadas a las 20 semanas de tratamiento con una DAS. Esto debido a los efectos que el TNF $\alpha$  tiene como mediador crítico de la disfunción neuronal y el deterioro cognitivo inducido por neuroinflamación.

De esta forma, se sugiere para futuros estudios abordar el impacto que tienen los desarreglos metabólicos en el orden cognitivo del sistema nervioso central realizando la medición de TNF $\alpha$  en LCR, así como aumentar el número de marcadores de inflamación, con la finalidad de obtener una mejor caracterización de la neuroinflamación. Proponemos la medición de IL-1 e IL-6 debido a que juegan un papel importante para el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo.

Finalmente, consideramos este estudio es de gran importancia dentro de la psicología, pues se abordan las repercusiones a nivel metabólico y cognitivo de llevar una dieta alta en carbohidratos, la cual ha ido en aumento en los últimos años a nivel mundial. Particularmente en México se estima que el 80% de la ingesta de alimentos no recomendables para consumo diario pertenece a la ingesta de bebidas altas en azúcares por parte de adultos y niños (Rodríguez-Burelo, Avalos-García y López-Ramón, 2014). Este tipo de dieta, normalmente se relaciona con el desarrollo de alteraciones metabólicas como ya se ha abordado a lo largo del trabajo, sin embargo, también se debería de resaltar las repercusiones en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. De igual manera este tipo de investigaciones

podría dar pie a campañas de promoción de la salud no solo orientadas a la prevención de sobrepeso y obesidad de niños en edad escolar, si no, también en las consecuencias que puede tener el consumo bebidas azucaradas en el rendimiento escolar.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Las ratas sometidas a una DAS al 20% (p/v) presentan alteraciones metabólicas propias del SM a las 20 y a las 40 semanas.
2. A las 20 y 40 semanas se observa una elevación en la concentración de CRP y TNF $\alpha$  siendo más evidente este cambio a las 20 semanas, lo cual indica la presencia de un estado inflamatorio crónico de bajo grado tanto inespecífico, en el caso del primer marcador, como de probable neuroinflamación, en el segundo caso.
3. Las ratas bajo una DAS al 20% (p/v) no muestran alteraciones significativas en la curva de aprendizaje a las 20 y 40 semanas de tratamiento.
4. A las 20 semanas de tratamiento con una DAS al 20% (p/v) las ratas muestran un deterioro significativo en la memoria de reconocimiento, el cual correlaciona con la elevación de la concentración de TNF $\alpha$  en sangre.

## REFERENCIAS

- Almeida-Suhett, C., Graham, A., Chen, Y., y Deuster, P. (2017). Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 $\beta$  expression in specific brain regions. *Psychology and Behavior*, 169, 130-140.
- Arisi, G. M. (2014). Nervous and immune systems signals and connection: Cytokines in hippocampus physiology and pathology. *Epilepsy y Behavior*, 38, 43-47.
- Baune, B. T., Wiede, F., Braun, A., Golledge, J., Arolt, V., y Koerner, H. (2008). Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147B(7), 1056–1064. doi:10.1002/ajmg.b.30712.
- Baxter, M.G. (2010). “I’ve seen it all before”: Explaining age-related impairments in object recognition Theoretical Comment on Burke et al. (2010). *Behavioral Neuroscience*. 124, 706-709. Citado en: Antunes, M. y Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, the procedure and its modifications. *Cogn Process*. 19, 93.110.
- Bermúdez, F., y Prado, R. (2001). *Memoria: dónde reside y cómo se forma*. México: Trillas.
- Belarbi, K., Jopson, T., Tweedie, D., Arellano, C., Luo, W., Greig, N. H., y Rosi, S. (2012). *TNF- $\alpha$  protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation*. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1).doi:10.1186/1742-2094-9-23.



- Bird, C. M. (2017). The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex*, 93, 155–165. doi:10.1016/j.cortex.2017.05.016.
- Blaser, R., y Heyser, C. (2015). Spontaneous Object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 1-12. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00183.
- Burgeiro, A., Cerqueira, M., Varela-Rodríguez, B., Nunes, S., Neto, P., Pereira, F., y Carvalho, E. (2017). Glucose and Lipid Dysmetabolism in a Rat Model of Prediabetes Induced by a High-Sucrose Diet. *Nutrients*, 9(6), 638. doi:10.3390/nu9060638.
- Buyukata, C., Vukalo, M., Xu, T. J., Khore, M. A., y Reichelt, A. C. (2018). Impact of high sucrose diets on the discrimination of spatial and object memories with overlapping features. *Physiology and Behavior*, 192, 127–133. doi:10.1016/j.physbeh.2018.02.027.
- Calder, P. C., Ahluwalia, N., Albers, R., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Haller, D., Holagate, S. T., Jönsson, L. S., Latulippe, M.E., Marcos, A., Moreines, J., Rini, C. M., Müller, M., Pawelec, G., Van Neerven, R. J. J., Watzi, B. y Zhao, J. (2013). A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. *British Journal of Nutrition*, 109(S1), S1–S34. doi:10.1017/s0007114512005119.
- Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D. y Ploix, C.C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev*, 2013, 48-65.

- Correale, J., y Villa, A. (2004). The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J.Neurol*, 251, 1304-1316.
- Cohen, R. M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T. M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., Bholat, Y., Vasilevko, V., Glabe, C. G., Breunig, J.J., Rakic, C., Davtayan, H., Agadjanyan, M.G., Kepe, V., Barrio, J., Bannykh, S., Szekely, C.A., Pechnick, R. N., y Town, T. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric A $\beta$  and frank neuronal loss. *J Neurosci*, 33, 6245-6256. doi:10.1523/JNEUROSCI.3672-12.20.
- Dinel, A.L., André, C., Aubert, A., Ferreira, G., Laé, S., y Castanon, N. (2011). Cognitive and emotional Alterations are related to hippocampal inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. *Plos One*, 6, 1-10.
- Elias, M.F., Elias, P.K., Sullivan, L.M., Wolf, P.A., y D'Angostino, R.B. (2003). Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham Heart Study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, 27, 260-268.
- Fernández, D. (2005). Una revisión de los modelos de la memoria de reconocimiento y sus hallazgos empíricos. *Revista de Psicología*. 5, 23-32.
- Gomez-Smith M., Karthikeyan S., Jeffers M., Janik R., Thomason L., Stefanovic B., y Corbett D. (2016). A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiology y Behavior*, 167, 382-391.
- Gómez-Crisóstomo, N. P., De la Cruz-Hernández, E. N., Méndez Méndez, E. R., Hernández-Landero, M. F., Camacho Liévano, J. U. y Martínez-Abundis, E. (2018). Differential

- effect of high-fat, high-sucrose and combined high-fat/high-sucrose diets consumption on fat accumulation, serum leptin and cardiac hypertrophy in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1–6. doi:10.1080/13813455.2018.1517181.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalstein, Y., Ben-Hur, T., ... Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10), 1106–1115. doi:10.1016/j.psyneuen.2007.09.004.
- Gunstad, J., Lhotsky, S., Wendell, C. R., Ferrucci, L., y Zonderman, A.B. (2010). Longitudinal Examination of obesity and cognitive function: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neuroepidemiology*, 34, 222-229.
- Hamasaki, M. Y., Machado, M. C. C., y Pinheiro da Silva, F. (2017). Animal models of neuroinflammation secondary to acute insults originated outside the brain. *Journal of Neuroscience Research*, 96(3), 371–378. doi:10.1002/jnr.24184.
- Hotamisligil, G. S., y Erbay, E. (2008). *Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases*. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 923–934. doi:10.1038/nri2449
- INEGI-INSP (2019). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 ENSANUT -Presentación de resultados*. Recuperado de: [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf).

- Kandel, E. (2007). En busca de la memoria. *Nacimiento de una nueva ciencia de la mente*. Buenos Aires: Katz. 143-203.
- Kandel, E., Schwartz, J. y Jessell, T. (1997). *Neurociencia y conducta*. Madrid: Prentice Hall
- Kendig, M. D. (2014). Cognitive and behavioural effects of sugar consumption in rodents. A review. *Appetite*, 80, 41–54. doi:10.1016/j.appet.2014.04.028
- Klur, S., Muller, C., Pereira de Vasconcelos, A., Ballard, T., Lopez, J., Galani, R., Certa, U., y Cassel, J. C. (2009). Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus*, 19(9), 800–816. doi:10.1002/hipo.20562.
- Kopp, A., Gross, P., Falk, W., Bala, M., Weigert, J., Buechler, C., Schölmerich, J. y Schäffler, A. (2009). *Fatty acids as metabolic mediators in innate immunity*. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(10), 924–933. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02185.
- Larqué, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Gutiérrez-Reyes, G., Moreno, J., Robles-Díaz, G., Hong, E. y Hiriart, M. (2011). Early Endocrine and Molecular Changes in Metabolic Syndrome Models. *IUBMB Life*, 63(10), 831-839.
- Lasselin, J., y Capuron, L. (2014). Chronic Low-Grade Inflammation in Metabolic Disorders: Relevance for Behavioral Symptoms. *Neuroimmunomodulation*, 21, 95-101.
- León-Pedroza, J. I., González-Tapia, L. A., del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., y González-Chávez, A. (2015). Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular

a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos*, 83(6), 543–551.  
doi:10.1016/j.circir.2015.05.041.

Lemos, C., Rial, D., Gonçalves, F. Q., Pires, J., Silva, H. B., Matheus, F. C. y Cunha, R. A. (2016). High sucrose consumption induces memory impairment in rats associated with electrophysiological modifications but not with metabolic changes in the hippocampus. *Neuroscience*, 315, 196–205. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.12.018.

Long, Z., Zhang, X., Sun, Q., Liu, Y., Liao, N., Wu, H., Wang, X. y Hai. Ch. (2017). Evolution of metabolic disorder in rats fed high sucrose or high fat diet: Focus on redox state and mitochondrial function. *General and comparative endocrinology*. 242, 92-100.

McAfoose, J., y Baune, B. T. (2009). Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(3), 355–366.  
doi:10.1016/j.neubiorev.2008.10.005.

Minihane, A. M., Vinoy, S., Russell, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M., Teeling, J. L., Blaak, E.E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdkern H. J., Kremer, B. H., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M. M., Williams, C. M. y Calder, P. C. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, 114(07), 999–1012. doi:10.1017/s0007114515002093.

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

- Murphy, K., Travers, P. y Walport, M. (2009). *Inmunobiología de Janeway*. México: McGraw-Hill.
- Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J.M., Femenía, T., García-Gutiérrez, M.S., García-Payá, M. E., Leiva-Santana, C., y Manzanares, J., (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Revista de Neurología*, 47, 137-145.
- Noble, E. E. y Kanoski, S. E. (2016). Early life exposure to obesogenic diets and learning and memory dysfunction. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 9, 7–14. doi:10.1016/j.cobeha.2015.11.014 .
- O'Leary, T., y Brown, R. (2011). The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *Journal of Neuroscience Methods*, 203, 315-324.
- Olsen, R. K., Moses, S. N., Riggs, L., y Ryan, J. D. (2012). The hippocampus supports multiple cognitive processes through relational binding and comparison. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6, 1-13. doi:10.3389/fnhum.2012.00146.
- Olszewski, R.T., Janezura, K. J., Bzdega, T., Der, E. K., Venzor, F., Rourke, B. O., Hark, T. J., Craddock, K. E., Balasubramanian, S., Moussa, C., y Neale, J. (2017). NAAG Peptidase Inhibitors Act via mGluR3: Animal Models of Memory, Alzheimer's, and Ethanol Intoxication. *Neurochem Res*. doi: [10.1007/s11064-017-2181-4](https://doi.org/10.1007/s11064-017-2181-4).
- Palumbo, M. L., Di Rosso, M. E., Simon, E. H., Gonzalez Murano, M. R., y Genaro, A. M. (2018). Altered interferon- $\gamma$  expression in lymphocytes as a potential peripheral

marker of chronic stress-induced cognitive deficit. *Cytokine*, 107, 26–34.  
doi:10.1016/j.cyto.2017.11.010.

Peña-Pérez, J., Gaspar-Cruz, D.R., Hernández-Medina, M.S., Islas-Vega, I., López-González, A., Reynoso-Vázquez, J. y Ruvalcaba-Ledezma, R. (2018). "Graves problemas epidemiológicos en México" La Obesidad, Sobrepeso y Síndrome metabólico. *Educación y Salud Boletín Científico de Ciencias de la Salud del ICSa*, 6(12), 1-10. doi: 10.29057/icsa.v6i12.3098.

Ramírez Alvarado, M.<sup>a</sup> M., y Sánchez Roitz, C. (2012). El factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1751-1757.  
<https://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6004>.

Ransohoff, R.M., Schafer, D., Vincent, A., Blachère, N.E. y Bar-Or, A. (2015). Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. *Neurotherapeutics*, 12, 896-909. [Doi: 10.1007/s13311-015-0385-3](https://doi.org/10.1007/s13311-015-0385-3).

Rodríguez-Burelo, M. del R., Avalos-García, M. I. y López-Ramón, C. (2014). Consumo de bebidas de alto contenido calórico en México: un reto para la salud pública. *Salud en Tabasco*, 20 (1), 28-33.

Rojas, R., Aguilar-Salinas, C.A., Jiménez-Corona, A., Shamah-Levy, T., Rauda, J., Ávila-Burgos, L., Villalpando, S. y Lazcano-Ponce, E. (2010). Metabolic syndrome in Mexican adults. Results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México*, 52, S11-S18.

- Rummel C., Inoue W, Poole S., Luheshi G.N. (2010). Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Mol Psychiatry* 15: 523–534.
- Salazar, A. J. A. (2011) *Diseño y construcción de un sistema de impedanciometría para la determinación de grasa corporal en ratas de laboratorio*. [Master's Thesis, Departamento de Ingeniería Eléctrica, CINVESTAV].
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., y Mohan, G. (2016). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 127(7), 624–633. doi:10.1080/00207454.2016.1212854.
- Sharma, S., Rakoczy, S., y Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87, 521-536.
- Soares, E., Prediger, R. D., Nunes, S., Castro, A. A., Viana, S. D., Lemos, C. y Pereira, F. C. (2013). Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. *Neuroscience*, 250, 565–577. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.07.055 .
- Sproston, N. R., y Ashworth, J. J. (2018). *Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection*. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00754.
- Stellwagen, D., y Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature*, 440(7087), 1054–1059. doi:10.1038/nature04671.
- Stern, C. E., y Hasselmo, M. E. (2009). Recognition Memory. *Encyclopedia of Neuroscience*, 49–54. doi:10.1016/b978-008045046-9.00784-1.
- Sternberg, R. J. (2011). *Psicología cognoscitiva*. México: Cengage Learning.



- Troncoso, J., Lamprea, M., y Cuestas, M.A. (2010). El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. *Acta Biol. Colomb.* 15, 207-222
- Tulving, E. (2000). Memory: An overview. En Kadzin, A. E. (Ed.). *Enciclopedia of psychology* (pp. 161-162).
- Vallières, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., y Sawchenko, P. E. (2002). Reduced Hippocampal Neurogenesis in Adult Transgenic Mice with Chronic Astrocytic Production of Interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*, 22(2), 486–492. doi:10.1523/jneurosci.22-02-00486.2002.
- Wärnberg, J., Cunningham, K., Romeo, J., Martínez-Gómez, D. y Marcos, A. (2011). Actividad física, ejercicio e inflamación. En A. Marcos (Ed.). *Inmunonutrición* (pp. 470-479). España: Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Wärnberg, J., Romeo, J. y Marcos, A. (2011). Obesidad e inflamación en el adolescente. En A. Marcos (Ed.). *Inmunonutrición* (pp. 502-508). España: Editorial Médica Panamericana, S.A.