



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

EFFECTO DE UN MODELO DE SÍNDROME
METABÓLICO SOBRE LA FUNCIÓN OLFATIVA,
MEMORIA Y PROCESOS NEURODEGENERATIVOS
EN RATAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

PEDRO ISAURO CLAVEL PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. BRYAN VÍCTOR PHILLIPS FARFÁN

PRESIDENTE: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

VOCAL: DRA. LAURA ELISA RAMOS LANGUREN

SECRETARIO: DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO

SUPLENTE: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA



Facultad
de Psicología

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma máter* que me formó desde el programa de Iniciación Universitaria y a la Facultad de Psicología, que hizo darme cuenta del rumbo profesional que quiero perseguir.

De la forma más sincera quiero expresar mi agradecimiento al laboratorio de Nutrición Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría, por haber sido el lugar de mi formación académica/profesional encaminada hacia la investigación científica. Muchísimas gracias a mi tutor y director de tesis, el Dr. Bryan Phillips por haberme recibido como alumno de servicio social, por guiarme en la comprensión de mi tema de investigación, por buscar de qué forma pudiéramos seguir desarrollando los experimentos, estableciendo contacto con otros investigadores que pudieran ayudarme, y por tener la confianza en aceptar las propuestas de los experimentos que propuse.

A la jefa del laboratorio, la Dra. Karla Carvajal, y a la Dra. Luz Camacho por ayudarme a resolver todas las dudas metodológicas de los experimentos realizados, así como estar al tanto de mi formación académica pasándome cursos y artículos relevantes, y permitirme participar en la publicación de dos revisiones científicas, les agradezco desde el fondo de mi corazón. Al Mtro. Marco y al Dr. Daniel por escucharme en los seminarios y promover la discusión necesaria para enriquecer mi tema. A Reinita por siempre brindar su ayuda y apoyo localizando reactivos y material de laboratorio y estar al pendiente del bienestar de todos los alumnos del laboratorio. A Paty por ayudarme en todos los trámites requeridos dentro del instituto y ser una fuente de apoyo con todos los alumnos.

Al laboratorio de Biología de la Reproducción, en especial a la Dra. Rosy Viguera y al técnico Pedro Medina, por ayudarme a obtener los cortes y las tinciones de los cerebros y brindarme su conocimiento en esas técnicas. A la Dra. Julieta y a la Dra. América, del laboratorio de Neurociencias, por brindarme su apoyo en el desarrollo de la técnica de Fluoro-Jade C. Al laboratorio de Inmunología Experimental, por la buena actitud al permitirnos usar el espectrofotómetro. Y a los miembros del bioterio del instituto, al Dr. Jairo y todo el personal que estuvo al cuidado de nuestras ratas.

Dedicatoria

A mis padres, por brindarme todo su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, procurar mi bienestar a costa de los sacrificios que tuvieron que hacer. Muchas gracias por nunca rendirse conmigo, se los agradezco desde el fondo de mi corazón. A mi papá, por ser el pilar fundamental de nuestra familia, procurar mi desarrollo y la oportunidad de tener una educación excelente, por trabajar muy duro para que nada nos faltara a la hora de haber emigrado a la Ciudad de México; y por haber sido responsable de mi interés desde niño en el área de ciencias biológicas viendo juntos documentales, programas de ciencia y comprarme mi primer microscopio. A mi mamá, por haber velado día y noche y estar siempre pendiente de mi bienestar cerca y lejos de casa, por escuchar y apoyar todas mis ideas, por ser cariñosa, amable, fuerte, valiente, por ser la mejor, muchísimas gracias. A mis hermanos por todo su cariño y apoyo durante todos estos años. A mi sobrinita Ximenita, por estar con nosotros en esta pandemia y haberme dado alegría en gran parte de la escritura de este trabajo. A mis padrinos, mi tío Abraham Clavel (QEPD) y mi tía Ana María por interceder y apoyar mi entrada a la UNAM. Gracias por su confianza. Todo lo que realice siempre irá por todos ustedes.

A mis amigas de la facultad por acompañarnos en todo este proceso de formación, compartir desvelos, alegrías y enojos en las materias que llevamos juntos y formar lazos inquebrantables de amistad. Gracias a Cinthia, Elisa, Valeria, Tania y Gaby, porque formamos una red de apoyo que nos ha permitido soportar y salir delante de los malos momentos, y por celebrar todas las alegrías que hemos vivido. Gracias por su empatía, confianza y cariño.

A mis amiguis del laboratorio, porque en los últimos años hemos convivido todo el día, todos los días. Supimos enfrentar los retos de algo nuevo y desconocido, juntos. Por crear un ambiente como ningún otro laboratorio, lleno de alegría, conversaciones nerds y ayuda incondicional. Gracias Adri, Betza, Lalo, Imelda. Y a Caro y Arturo por escucharme y ayudarme en los seminarios.

Índice

Abreviaturas	5
Resumen	6
1. Introducción	8
2. Antecedentes	10
3. Planteamiento del problema	20
4. Objetivo general	21
5. Hipótesis	21
6. Método	22
7. Resultados	29
8. Discusión	35
9. Conclusión	41
10. Referencias	44
11. Anexos	58

Abreviaturas

(APP) Proteína precursora amiloide

(β A) Beta amiloide

(BACE-1) Beta secretasa

(DMT2) Diabetes mellitus tipo 2

(EA) Enfermedad de Alzheimer

(EO) Estrés oxidante

(GSK-3) Glucógeno sintasa quinasa 3

(IDE) Enzima degradadora de insulina

(NOR) Reconocimiento de objeto novedoso

(RI) Resistencia a la insulina

(SNC) Sistema nervioso central

(SM) Síndrome metabólico

(STZ) Estreptozotocina

Resumen

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un déficit progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas. Las investigaciones clínicas demuestran que alteraciones en la función olfativa ocurren de manera temprana en pacientes con Alzheimer. Un factor de riesgo muy importante para desarrollar Alzheimer es el síndrome metabólico, que es un conjunto de alteraciones clínicas, metabólicas y bioquímicas. Dos alteraciones presentes en el síndrome metabólico, y que participan en la formación de placas neuríticas, son la resistencia a la insulina y el estrés oxidante.

Los modelos de síndrome metabólico en roedores utilizan intervenciones farmacológicas o modificaciones en la alimentación como el consumo de dietas altas en grasas. Sin embargo, estas intervenciones generan alteraciones que asemejan a etapas tempranas de la diabetes mellitus tipo 2, en donde la producción de insulina se encuentra disminuida. No existe información acerca de modelos que asemejen alteraciones tempranas en el metabolismo y que se relacione con las alteraciones involucradas en la formación de placas neuríticas. Tampoco se sabe si la resistencia a la insulina y el estrés oxidante participan en el deterioro del olfato que se observa en los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

En esta investigación, se utilizó un modelo de síndrome metabólico inducido por una dieta alta en carbohidratos en ratas Wistar, el cual se conoce que genera resistencia a la insulina, pero el metabolismo de glucosa permanece sin cambios. Se realizaron las pruebas de habituación/deshabituación y la prueba del chocolate escondido para evaluar el olfato, y la prueba de reconocimiento del objeto novedoso para evaluar la memoria. Se analizó la activación de dos proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina: el receptor a insulina y la proteína AKT, y la expresión de la proteína precursora amiloide y de la enzima beta secretasa en el hipocampo y en el bulbo olfatorio de las ratas. Se determinaron los niveles de malondialdehído, un producto de la lipoperoxidación, en las mismas áreas del cerebro. Y se buscaron cambios en la morfología neuronal, utilizando la tinción de violeta de cresilo, y marcas de neurodegeneración, con la tinción Fluoro Jade-C, en cortes del hipocampo y bulbo olfatorio.

El síndrome metabólico inducido por una dieta alta en carbohidratos provocó alteraciones en el olfato y un mejor desempeño en la memoria. La disfunción olfativa estuvo acompañada por una resistencia a la insulina en el bulbo olfatorio, pero sin cambios en la expresión de la proteína precursora amiloide ni en los niveles de malondialdehído. Por otro lado, el mejor desempeño de la memoria fue acompañado por una mayor activación de la vía de la insulina, menor expresión de la proteína precursora amiloide y menores niveles de malondialdehído en el hipocampo. Se necesita estudiar otros elementos, tanto del síndrome metabólico como de la enfermedad de Alzheimer, que pudieran estar involucrados en la disfunción olfativa que se observó con este modelo.

Palabras clave:

Enfermedad de Alzheimer, resistencia a la insulina, estrés oxidante.

1. Introducción

En México, la población de adultos mayores a 65 años en el 2015 era de 12.4 millones de personas, representando 6.8 % de la población. El porcentaje de este sector crecerá a 10.3 % de la población nacional en el 2030 y 16.8 % para 2050 (Consejo Nacional de Población, 2016; Rivera-Silva, Rodríguez-Reyes & Treviño-Alanís, 2018). El envejecimiento es un factor de riesgo para desarrollar demencia; que es un trastorno crónico y progresivo, caracterizado por una pérdida cognitiva (National Institute of Health, 2017). Entre las funciones cognitivas que son afectadas están la memoria, orientación, aprendizaje y lenguaje. Estas alteraciones son acompañadas o precedidas por deterioro del control emocional, conducta social o motivación (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común, representando 60 a 70% de los casos (Organización Mundial de la Salud, 2019). Esta enfermedad neurodegenerativa irreversible e incurable se caracteriza por un déficit progresivo de la memoria y cognición (Zvěřová, 2019). En su última etapa, los pacientes se vuelven completamente dependientes de cuidadores externos (Sanes & Jessell, 2013). Se estima que para el año 2050, en México existirán 3.5 millones de adultos mayores con EA (Gutierrez-Robledo & Arrieta-Cruz, 2015) retando a sus familiares y cuidadores, así como a las políticas de salud nacionales.

Las investigaciones clínicas demuestran que se presentan alteraciones en la función olfativa de manera temprana en los pacientes con la EA (Devanand, 2016; Kreisl et al., 2018). Las alteraciones en el olfato también están presentes en otras enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Huntington y otras (Hawkes, 2006). Esto sugiere que estos cambios en el olfato podrían utilizarse como marcadores tempranos del inicio de los trastornos neurodegenerativos.

Factores de riesgo de la EA

La EA se puede clasificar en dos tipos por su patogénesis: familiar y esporádica (Sanes & Jessell, 2013). La EA familiar se da por la influencia de mutaciones en genes que codifican para proteínas implicadas en la formación de placas neuríticas. Estas proteínas son la proteína precursora amiloide (APP), así como presenilina 1 y 2 (Vandenberghe & Tournoy,

2005). Sin embargo, menos de un 1 % de los casos totales corresponden a EA familiar (Blennow, de Leon & Zetterberg, 2006).

Se han descrito diversos factores de riesgo para el desarrollo de EA esporádica, como: poca actividad física, baja reserva cognitiva (debido a bajos niveles de educación, poca actividad cognitiva), pérdida de la audición, trauma craneoencefálico, depresión y riesgos vasculares debidos a diabetes, hipertensión, dislipidemia, obesidad y síndrome metabólico (Atri, 2019).

Síndrome metabólico

Un importante factor de riesgo para el desarrollo de la EA es padecer el síndrome metabólico (SM) o diabetes en la edad adulta (Gutierrez-Robledo & Arrieta-Cruz, 2015). El SM es un conjunto de alteraciones clínicas, metabólicas y bioquímicas, como la adiposidad central, hipertensión, hiperglicemia y dislipidemias (Zafar et al., 2018). El SM incrementa el riesgo de desarrollar diabetes mellitus, enfermedades cerebro-vasculares y cáncer (Bokura et al., 2008; Brauna et al., 2011; International Diabetes Federation, 2005).

Factores de riesgo del SM

La patogénesis del SM es compleja, ya que resulta de la interacción de factores genéticos y ambientales, éstos últimos incluyen una baja o nula actividad física y una alta ingesta calórica (Zafar et al., 2018). La alta disponibilidad de alimentos procesados e hipercalóricos (con altos porcentajes de azúcares y grasas) ha promovido un aumento en la prevalencia del SM (Pérez-Herrera & Cruz-López, 2019). Estos elementos, aunados a baja actividad física, resultan en altos porcentajes de alteraciones metabólicas en la población adulta. En la población mexicana 75.8 % tiene sobrepeso y obesidad, 10.3 % padece diabetes mellitus y 16.6 % sufre de hipertensión (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2019).

Diagnóstico del SM

Diversas organizaciones internacionales han propuesto criterios para el diagnóstico del SM (Huang, 2009). Sin embargo, de acuerdo a la unificación de criterios (Alberti et al., 2009), se considera que una persona padece de SM si presenta 3 de las siguientes 5 alteraciones:

- Incremento de la circunferencia abdominal (valores ajustados a cada grupo étnico en donde se realice la medición).
- Elevación de triglicéridos: mayores o iguales 150 mg/dL.
- Disminución del colesterol HDL: menor de 40 mg/dL en hombres o menor de 50 mg/dL en mujeres.
- Elevación de la presión arterial: sistólica mayor o igual a 130 mmHg y/o diastólica mayor o igual a 85 mmHg.
- Elevación de la glucosa en ayuno: mayor o igual a 100 mg/dL.

El aumento de la circunferencia abdominal es uno de los elementos claves para el diagnóstico del SM. Este incremento se debe a una mayor acumulación de tejido adiposo visceral, el cual tiene una correlación positiva con el diagnóstico del SM (Hung et al., 2014). Los individuos con mayor grado de adiposidad (acumulación de tejido adiposo) también presentan un estado proinflamatorio y dislipidemias (Rochlani et al., 2017). Se ha propuesto que estos cambios dan origen a la resistencia a la insulina (RI) y al estrés oxidante (EO), condiciones presentes en el SM (Zafar et al., 2018).

Justificación

Los adultos mayores tienen una alta prevalencia de enfermedades crónicas como obesidad y síndrome metabólico, que son factores de riesgo para el desarrollo de demencias como la EA. En nuestro país, la epidemia de obesidad y SM aumentará exponencialmente el número de adultos mayores con obesidad y que padezcan también demencias como la EA. Por lo tanto, conocer los mecanismos tempranos que incrementan el riesgo de padecer EA asociado a dietas altas en azúcar proporcionará métodos de intervención y tratamiento más efectivos, que retrasen o prevengan la aparición de esta enfermedad.

2. Antecedentes

Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

En una guía para el diagnóstico de la EA cabe destacar: cumplir con los criterios de demencia (Anexo 1), inicio progresivo de la enfermedad, déficits cognitivos amnésicos (dificultad en aprendizaje y evocación de nueva información) y no amnésicos (lenguaje, visión o funciones ejecutivas) y sin evidencia de otras lesiones o trastornos neurológicos

(McKhann, 2012). El diagnóstico definitivo de la EA se obtiene post-mortem, al observar lesiones características en los cerebros. Estas son las placas neuríticas, formadas por péptidos beta amiloide (β A), y los ovillos neurofibrilares, formados por proteínas tau hiperfosforiladas (Mena López et al., 2003).

Teoría amiloidogénica de la enfermedad de Alzheimer

Por más de 20 años, la teoría amiloide ha predominado el campo de estudio de la EA. Esta teoría postula que “el depósito de los péptidos β A, el principal componente de las placas neuríticas, es el agente principal de la patología de la EA y que los ovillos neurofibrilares, pérdida de neuronas, daño vascular y demencia son resultado de esta acumulación” (Hardy & Higgins, 1992).

Proteína precursora amiloide

Los péptidos β A son el mayor elemento que conforman a las placas neuríticas. Se forman debido al procesamiento inadecuado de la proteína precursora amiloide (APP, Sajjad et al., 2018). La APP es una proteína transmembranal de un solo paso que cuenta con un dominio extracelular grande (O'Brien & Wong, 2011). Diversas variantes de esta proteína se expresan en tejidos de todo el cuerpo. La isoforma APP695 es la que predominantemente se expresa en el cerebro (Van Der Kant & Goldstein, 2015). No se conoce con exactitud la función de esta proteína, sin embargo, las investigaciones sugieren que está involucrada en diversas funciones. Algunos ejemplos son: promover la sinaptogénesis, axonogénesis, adhesión neuronal e inducir la activación de vías relacionadas a apoptosis (Bateman, 2019).

Procesamiento de la APP

La APP tiene dos vías de procesamiento: la no amiloidogénica y la amiloidogénica (Mena López et al., 2003). En la primera, las enzimas alfa y gama secretasas cortan secuencialmente a la APP liberando diversos fragmentos (Figura 1A) (Marr, 2016; Penke, Bogár & Livia, 2017). En la vía amiloidogénica, la acción de la enzima beta secretasa (BACE-1) produce un péptido que es procesado por la gama secretasa, liberando β A (Marr, 2016, Figura 1B).

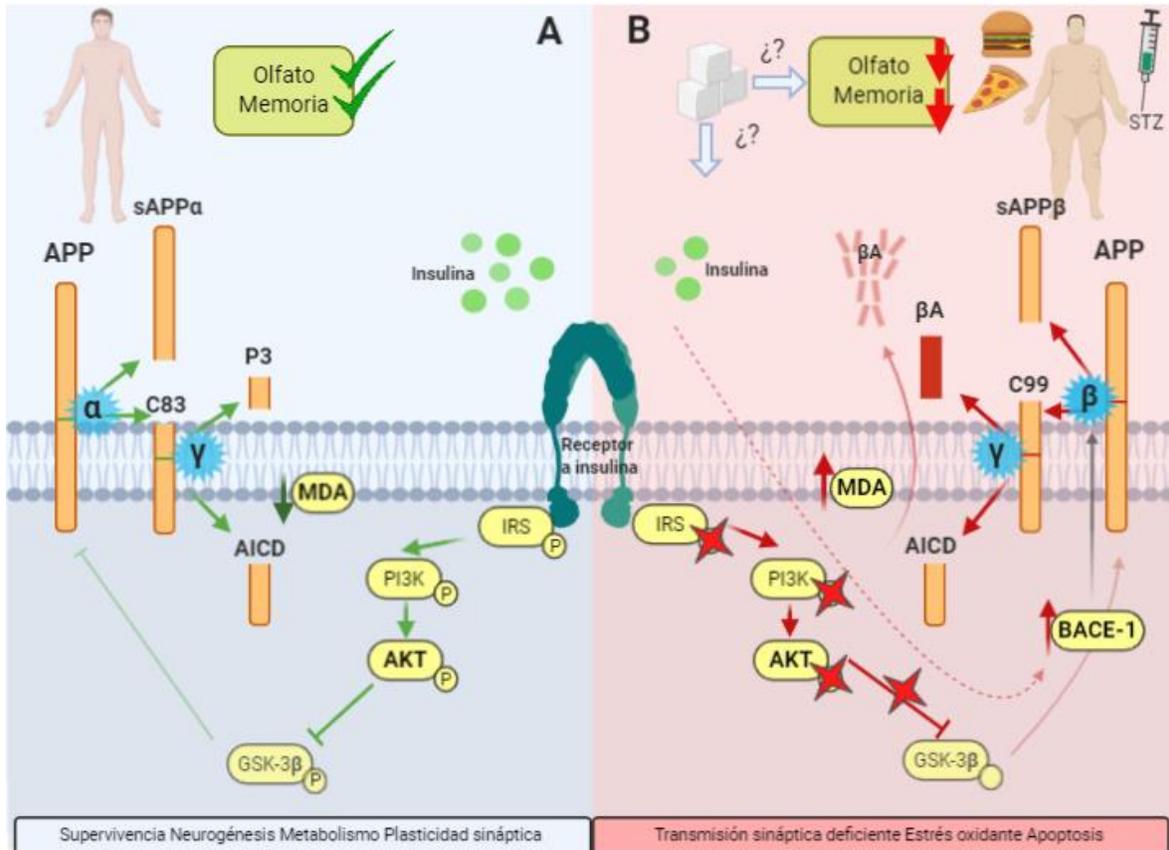


Figura 1. Vía de señalización de la insulina cerebral en relación a la EA. **A)** En condiciones normales, la cascada de la insulina fomenta el correcto funcionamiento neuronal, participa en el procesamiento no amiloidogénico de la APP y mantiene niveles de liperoxidación bajos permitiendo un funcionamiento normal del olfato y la memoria. **B)** La resistencia a la insulina inducida por dietas altas en grasas favorece el procesamiento amiloidogénico de la APP (acumulación de péptidos β A) y mayores niveles de liperoxidación causando la disfunción del olfato y memoria. Modificada de Marr, 2016 y Pandini et al., 2013, creada con biorender.com.

Alteraciones cognitivas y sensoriales en Alzheimer: memoria y olfato

El principal cambio que notan los pacientes con EA y las personas que conviven con ellos es el olvido de información tanto semántica como declarativa (Jahn, 2013). A este problema le subyace un deterioro progresivo en la memoria, que representa el síntoma clínico más evidente (Sperling et al., 2010). La memoria de reconocimiento, la cual se refiere a la habilidad para juzgar si se ha encontrado un estímulo específico anteriormente y

permite distinguir eventos familiares de novedosos en nuestra vida cotidiana (Warburton, 2018), se encuentra frecuentemente alterada en personas con envejecimiento y pacientes con EA (Callahan & Terry, 2018).

Estudios longitudinales recientes indican que adultos mayores con bajos puntajes en pruebas olfativas tienen una alta probabilidad de mostrar un declive cognitivo mayor y de desarrollar demencia en los siguientes años que los adultos mayores con una función olfativa sana (Dintica et al., 2019; Kreisl et al., 2018; Yaffe et al., 2017). Debido a que las alteraciones en el olfato preceden a los síntomas clásicos de enfermedades neurodegenerativas (como la pérdida de la memoria en la EA), la disfunción olfativa ha sido propuesta como un biomarcador de inicio temprano de demencia (Devanand, 2016; Dintica et al., 2019; Zanto et al., 2010). En los cerebros de personas con EA temprana, se ha encontrado una mayor acumulación de péptidos βA en el bulbo olfatorio que en el resto del cerebro (T. Kovács, Cairns & Lantos, 1999; Tibor Kovács, Cairns & Lantos, 2001).

Se han reportado alteraciones de la función olfativa en modelos animales de la EA (Prediger et al., 2019). En ratones transgénicos que sobreexpresaban la APP humana se encontró una disminución de la función olfativa, así como una acumulación temprana de péptidos βA en el bulbo olfatorio (Wesson et al., 2013). Asimismo, en un ratón triple transgénico de la EA se encontró una alteración en el desempeño de una tarea de memoria olfativa y acumulación de péptidos βA en centros de procesamiento olfativo, como la corteza anterior piriforme y entorrinal (Cassano et al., 2011).

Poco se sabe sobre el origen de las placas neuríticas. Menos de un 1 % de los casos totales de EA corresponden a factores genéticos (Blennow et al., 2006). Además, los fármacos que se han desarrollado para combatir la EA, promoviendo el desecho de los péptidos βA o inhibiendo la actividad de la enzima BACE-1, han fallado en demostrar mejoría para los pacientes (Abbott & Dolgin, 2016; Carroll, 2017). Por tanto, se ha propuesto que las lesiones histopatológicas de la EA son una consecuencia de un problema que subyace a la EA (Dolgin, 2016).

Intersección de la enfermedad de Alzheimer y síndrome metabólico

Estudios recientes muestran que existen alteraciones en la señalización de la insulina en la EA (Kubis-Kubiak, Rorbach-Dolata & Piwowar, 2019). Hay disminución en la expresión

del receptor a insulina inducida por oligómeros β A en el cerebro de pacientes humanos con EA (Kang, Lee & Lee, 2017). Por lo anterior se ha propuesto que se conozca a la EA como diabetes mellitus tipo 3 (de la Monte & Wands, 2008).

Estos cambios van acompañados por estrés oxidante (Maslov et al., 2019). El EO se refiere al desequilibrio entre la oxidación y los mecanismos antioxidantes, que lleva a la generación de radicales libres y a una disminución en la velocidad de su neutralización (Barbosa et al., 2008). El cerebro de personas con EA presenta un daño oxidante significativo, en donde la acumulación de péptidos β A trae como consecuencia un aumento del EO (Huang, Zhang, & Chen, 2016). Sin embargo, se ha descrito que el EO puede participar en la patogénesis de la EA. Se ha encontrado aumento de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, aumento de productos de oxidación de lípidos, proteínas, ADN y ARN en el cerebro de pacientes en etapas tempranas de la EA (Cheignon et al., 2018). Por ello, se desconoce si el EO es una causa o una consecuencia en la EA (Luque-Contreras et al., 2014).

La vía de señalización de la insulina

La insulina es una hormona de 51 aminoácidos producida por las células beta pancreáticas. Su síntesis y liberación se debe a un aumento de la glucosa en la sangre circulante (Arnold et al., 2018). El receptor a insulina es expresado en casi todas las células del organismo. Ejerce un importante rol fisiológico en el hígado, músculo y en el tejido adiposo (Watanabe et al., 1998). En el cerebro, los mayores niveles de expresión del receptor a insulina se encuentran en el bulbo olfatorio y cerebelo, seguidos del hipotálamo e hipocampo (Fernandez & Torres-Alemán, 2012).

La insulina entra al parénquima cerebral atravesando la barrera hematoencefálica y el plexo coroideo (Fernandez & Torres-Alemán, 2012). Se ha observado que un 1 % de la insulina sistémica alcanza el sistema nervioso central (SNC) (Plum, Schubert & Bru, 2005). Sin embargo, algunas áreas del cerebro no están protegidas por la barrera hematoencefálica, como el bulbo olfatorio. En humanos, la administración intranasal de insulina aumenta los niveles de la hormona en el líquido cefalorraquídeo sin afectar los niveles sistémicos. (Lee et al., 2016).

Tras la activación del receptor de la insulina, se activan señales metabólicas involucradas en la captación y utilización de la glucosa; y señales mitogénicas (Petersen & Shulman, 2018). Una proteína río debajo de la vía de señalización de la insulina es la proteína AKT, la cual se ha reportado tiene más de 100 proteínas blanco a las cuales fosforila directamente. Entre sus blancos se incluyen proteínas cinasas, factores de transcripción, proteínas de tráfico vesicular, enzimas metabólicas entre otras. Esto sugiere un amplio y diverso repertorio de efectos río abajo en los que están involucradas la supervivencia, la proliferación, el metabolismo y el crecimiento celular (Manning & Toker, 2017).

Resistencia a la insulina y modelos de SM

La incapacidad de los tejidos blancos de responder a los niveles ordinarios de insulina circulante es lo que se conoce como la resistencia a la insulina (Mlinar et al., 2007). Esta incapacidad de respuesta se puede deber a la regulación a la baja de los receptores a insulina, una incapacidad de unión de la insulina a su receptor o una activación defectuosa de la vía de señalización de la insulina (Arnold et al., 2018).

Para su estudio en el laboratorio, se han desarrollado diversos modelos animales (en roedores principalmente) del SM. Entre los modelos más representativos se encuentran aquellos que son inducidos por manipulaciones nutrimentales, en donde se somete al roedor a una dieta alta en carbohidratos y/o grasas; y los modelos inducidos farmacológicamente, en donde se tratan a los roedores con fármacos para alterar el metabolismo de carbohidratos. Uno de los fármacos que se utilizan es la estreptozotocina (STZ, Carvajal, et al., 2017). La STZ es un antibiótico con efectos diabetogénicos, debido a la destrucción de las células beta pancreáticas, generando una deficiencia en la producción de insulina e hiperglucemia, lo que asemeja un estado de diabetes tipo 1 (Furman, 2015). Además, se ha demostrado que la STZ genera hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, elementos presentes en el SM y la diabetes mellitus tipo 2 (Reaven & Reaven, 1974).

De acuerdo al porcentaje de grasas agregadas a la dieta, se genera un modelo de obesidad en menores tiempos, lo cual es una ventaja porque reduce los costos de mantener alojados a los roedores (Speakman, 2019). Las dietas altas en grasas generan hiperinsulinemia, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, acumulación de tejido adiposo

visceral y aumento del peso corporal, modelando un estado severo del SM (Lang et al., 2019). En una modificación de esta dieta, se utiliza junto con dosis bajas de STZ para imitar el curso natural de la DMT2 (Srinivasan et al., 2005).

Las dietas altas en carbohidratos utilizan sacarosa o fructosa como sus principales sustratos energéticos. Este tipo de dieta comúnmente se administra diluida en el agua para beber de los animales, en porcentajes del 10 – 30 % (Rodríguez-Correa et al., 2020). Las alteraciones principales que producen este tipo de dieta son la hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y aumento del tejido adiposo. La ventaja de este tipo de dieta es que modelan fases tempranas del SM, en donde los niveles circulantes de glucosa se mantienen normales pero existe resistencia a la insulina (Rodríguez-Correa et al., 2020).

Alteraciones sensoriales y cognitivas asociadas a la resistencia a la insulina

Se ha reportado en el invertebrado *Caenorhabditis elegans* que la vía de la insulina está involucrada en los procesos olfativos utilizados por este organismo en la búsqueda de alimento (Jiu et al., 2010). La evidencia clínica y los trabajos con modelos animales de obesidad y SM han arrojado la hipótesis de que los cambios en la vía de la insulina pueden ir acompañados de alteraciones olfativas que impactan en el aumento de la sensibilidad a alimentos hipercalóricos y una falla en la detección y categorización de olores (Rebolledo-Solleiro et al., 2020). En un modelo de ratas diabéticas inducidas por una inyección de STZ se encontró que las alteraciones en la función olfativa pueden ser debidas a alteraciones histológicas (una disminución del tamaño de las neuronas granulares y mitrales) y microvasculares del bulbo olfatorio (Faizal & Khan, 2017).

El efecto de las dietas altas en carbohidratos sobre la cognición ha sido ampliamente reportado. En un modelo de SM inducido por una administración de sacarosa al 20% por 20 semanas, en ratas Wistar, se encontraron alteraciones en el aprendizaje motor, resistencia a la insulina y marcadores de inflamación. Sin embargo, no se encontraron conductas relacionadas a ansiedad (Flores-Fuentes et al., 2021). Otro grupo de investigación encontró que utilizando el mismo porcentaje de sacarosa diluida por 24 semanas generaba un deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial, así como una alteración de la potenciación a largo plazo en el hipocampo (B. Zhao et al., 2020). Por último, se encontró

una correlación negativa entre los niveles circulantes de glucosa circulante y el tiempo de exploración hacia el objeto novedoso tras una administración de sacarosa al 32 % por 8 semanas (Jurdak & Kanarek, 2009). En los modelos de SM inducidos por administración de sacarosa, se ha propuesto que el daño cognitivo observado es independiente de la obesidad, sino por otros factores como procesos de inflamación sistémica (Beilharz, Maniam, & Morris, 2015).

En un modelo de DMT2, inducido por una administración de fructosa por 8 semanas en ratones, se encontraron alteraciones en pruebas olfativas (mayor latencia para localizar la pieza de comida escondida y una falla ante la deshabitación frente un nuevo estímulo olfativo). Estos cambios fueron acompañados por una disminución en la amplitud de la corriente de neuronas del epitelio olfatorio (patch clamp y electro-olfatograma), disminución en marcadores de apoptosis y un número mayor de neuronas olfativas maduras (Rivière et al., 2016). (justificación fructosa=sacarosa)

Se ha evaluado el desempeño de una cepa de ratas diabéticas y ratas tratadas con una dosis única de STZ en el laberinto acuático de Morris. Se encontró una correlación positiva entre el grado de resistencia a la insulina y la latencia de escape. Además, se encontró una menor viabilidad neuronal y menor densidad dendrítica en el área del CA1, así como menores niveles de fosforilación de la proteína AKT (Xiang et al., 2015). Diversos grupos de investigación han reportado que la STZ sistémica genera alteraciones en la memoria espacial y en la plasticidad sináptica (Xiang, 2015; Zhao & Townsend, 2009). De igual forma, la administración intracerebral de STZ es capaz de generar alteraciones en el aprendizaje y memoria e inhibir la función del receptor de insulina (de la Monte & Wands, 2008).

La administración de STZ junto con una dieta alta en grasas genera una falla en la memoria espacial, una disminución de los niveles de insulina cerebral y bajos niveles de fosforilación de la proteína AKT en hipocampo y corteza (Kang, et al., 2017). Dietas altas en grasas impactan el aprendizaje y la memoria en roedores (Cordner & Tamashiro, 2015), así como dietas altas en carbohidratos (Beilharz, Maniam & Morris, 2014; Buyukata et al., 2018). En cambio, la reactivación de la señalización de la insulina en el cerebro tiene un efecto benéfico en el desempeño en tareas cognitivas (W. Q. Zhao & Townsend, 2009). Fármacos sensibilizadores a la insulina o antidiabéticos (Kang, et al., 2017; Lee et al.,

2016) o alimentos altos en fibras, como el nopal (Sánchez-Tapia et al., 2017), han demostrado restaurar la vía de señalización de insulina y rescatar el desempeño normal en pruebas de memoria espacial, en roedores sometidos a dietas altas en grasas.

Enfermedad de Alzheimer y resistencia a la insulina

Existe una influencia bidireccional entre la RI y la acumulación de péptidos β A y el comienzo de la EA. Bajos niveles de insulina central e hiperinsulinemia sistémica promueven la acumulación de los péptidos β A, así como una disminución en su degradación (Kullmann et al., 2016). En cambio, la inyección intracerebroventricular. de oligómeros β A produce RI e intolerancia a la glucosa sistémica (Kubis-Kubiak et al., 2019).

Un mecanismo propuesto para la acumulación de péptidos β A es mediante la disminución de su catabolismo mediante la enzima degradadora de insulina (IDE). Esta enzima puede ser localizada en el citoplasma, membranas celulares, algunos organelos como los endosomas o mitocondria y puede ser secretada al espacio extracelular. Se ha propuesto que un estado de hiperinsulinemia central, la insulina compite por la IDE, lo que genera una acumulación de péptidos β A (Pivovarova et al., 2016).

Experimentos *in vitro* en cultivos celulares de neuronas, demostraron que la insulina disminuye la acumulación de péptidos β A mediante la activación de la proteína AKT, lo que promueve una defosforilación de la APP y una disminución de su expresión (Pandini et al., 2013). Otros estudios demostraron que cuando AKT no está activa, se pierde la fosforilación de GSK-3 β , lo que lleva a una hiperfosforilación de la proteína tau, componente principal de los ovillos neurofibrilares (Kang Kim et al., 2017).

Distintos grupos de investigación han reportado el efecto que tienen las dietas altas en carbohidratos sobre la patogénesis de la EA. El tratamiento con sacarosa generó la hiperfosforilación de la proteína tau y una pérdida en la inhibición de la GSK-3 β en el hipocampo de ratones C57BL/6 (B. Zhao et al., 2020). En ratones doble transgénico de la EA se encontró que tras una alimentación con sacarosa al 10 % por 25 semanas hubo un incremento en los niveles y en el depósito de beta amiloide hipocampales. Este aumento se generó por un incremento en la expresión de la proteína apoE (Cao et al., 2007). Alimentando a ratones transgénico con una dieta alta en sacarosa (dentro de los pellets de

comida) provocó un aumento en los niveles de beta amiloide cortical, generó neuroinflamación y disminuyó la sensibilidad a la leptina (Yeh et al., 2020).

En un modelo transgénico de EA alimentado con una dieta alta en grasas, la administración de una dosis única de insulina sistémica aumenta los niveles plasmáticos del péptido β A de 42 aminoácidos, lo que indica que además de evitar la acumulación de los péptidos β A, la insulina tiene un efecto sobre su desecho fuera del SNC. Este aumento plasmático de β A correlaciona positivamente con el desempeño en pruebas de memoria (Vandal et al., 2014).

Por último, la RI inducida por STZ intraperitoneal favorece el procesamiento amiloidogénico de la APP mediante la regulación a la alta de la traducción de la enzima BACE-1 (Devi et al., 2012). En conclusión, de acuerdo a los estudios previamente descritos, defectos en la señalización de la insulina conllevan a un aumento y acumulación de los péptidos β A por medio de: la disminución de su degradación por la IDE, mayor expresión de la APP y un mayor procesamiento de ésta mediante la BACE-1; y una disminución en su desecho fuera del SNC (Figura 1).

A pesar de que el bulbo olfatorio de los roedores el área cerebral con mayor expresión del receptor a insulina (Fernandez & Torres-Alemán, 2012) y de la proteína BACE-1 (Laird et al., 2005), se ha encontrado poca a nula evidencia si la RI tiene un efecto sobre la mayor expresión de la APP y la BACE-1, lo cual aumentaría el riesgo de producción y acumulación de péptidos β A en esta región. Tampoco se sabe si estas alteraciones, provenientes de una señalización alterada de la insulina, causan las alteraciones tempranas en el olfato.

Otra consideración es que las investigaciones indujeron la resistencia a la insulina mediante una dieta alta en grasas o STZ. Las dietas altas en grasas son efectivas en generar RI y alteraciones en el metabolismo de la glucosa en pocas semanas (Rodríguez-Correa et al., 2020). Sin embargo, existe poca evidencia del efecto de dietas altas en carbohidratos sobre procesos amiloidogénicos en el bulbo olfatorio.

Estrés oxidante y enfermedad de Alzheimer

En un modelo transgénico de EA en ratas se encontró mayor acumulación de isoprostano en la corteza e hipocampo de los roedores a los 8 meses de edad, mientras que la acumulación

de péptidos β A fue detectada a los 12 meses (Praticò et al., 2001). En cultivos de neuroblastos olfatorios de pacientes con EA, se encontró niveles mayores de daño por estrés oxidante (Ghanbari et al., 2004).

Se ha demostrado que el EO puede reducir la activación de la proteína AKT causando un hipometabolismo de glucosa y RI en los adipocitos. En este sentido, la suplementación de antioxidantes como los flavonoides, disminuyeron los niveles de malondialdehído (MDA) y redujeron la RI (Maslov et al., 2019). También se ha reportado que ratas alimentadas con una dieta alta en grasas causó un incremento en los niveles de MDA y otros productos del EO, así como una disminución en la expresión de la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, principales moléculas antioxidantes (Mahmoudi, et al., 2018).

Existen niveles elevados de MDA, de péptidos β A, hiperfosforilación de tau y una disminución en los niveles de activación de la proteína AKT asociados a la EA. El tratamiento con una glicoproteína (lactoferrina) recuperó la activación de esta proteína y disminuyó los niveles de MDA, péptidos β A y la hiperfosforilación de tau (Mohamed, Salama & Schaalán, 2019).

3. Planteamiento del problema

Existen varios modelos de SM, en especial en roedores, que reciben tratamientos nutrimentales o farmacológicos. Las dietas altas en grasas (por si solas o junto con la administración de STZ) son los métodos más utilizados, ya que requieren pocas semanas de tratamiento; sin embargo, estos tratamientos modelan fases tardías del SM. Los animales tratados con dietas altas en carbohidratos permiten modelar etapas tempranas del SM, que exhiben RI pero la captación de glucosa permanece sin cambios. Las alteraciones en la vía de la insulina causan una menor plasticidad sináptica, densidad dendrítica y viabilidad neuronal en el hipocampo; mientras que la restauración de la vía de la insulina trae como consecuencia una mejora en la memoria.

Además de su efecto deletéreo en el olfato y la memoria, las alteraciones en la vía de la insulina están presentes en la EA, siendo un mecanismo común para ambas condiciones. Se ha descrito que la RI se involucra en la producción y acumulación de péptidos β A, así como el aumento en la expresión de proteínas involucradas en la formación de estos

péptidos: la APP y enzima BACE-1. Estos cambios pueden ir acompañados o precedidos por productos de lipoperoxidación, como el MDA, generados por el EO. Sin embargo, se desconoce si las alteraciones en el olfato y memoria, así como en la expresión de proteínas alteradas en la EA, están presentes en etapas tempranas del SM. La identificación de los factores que promueven los síntomas tempranos en la EA permitirá dirigir tratamientos para evitar, frenar o revertir procesos neurodegenerativos.

Este trabajo busca responder a las siguientes preguntas de investigación: ¿Existe una alteración en el olfato y en la memoria en el modelo de SM inducido por una dieta alta en carbohidratos? ¿Existen procesos neurodegenerativos en este modelo? y ¿Qué elemento del SM (la RI o el EO por si solos o en conjunto) está implicado en el desarrollo de la disfunción olfativa y de la pérdida de memoria?

4. Objetivo general

Evaluar si se presentan alteraciones en el olfato y la memoria en un modelo de SM. Evaluar si la resistencia a la insulina y/o el estrés oxidante alteran las proteínas implicadas en la formación de placas neuríticas en el bulbo olfatorio e hipocampo.

Objetivos específicos

Evaluar la memoria y olfato en ratas con SM.

Analizar la expresión de la proteína precursora amiloide (APP) y proteína beta secretasa (BACE-1) en el hipocampo y bulbo olfatorio en ratas con SM.

Analizar la expresión y activación del receptor a insulina y proteína AKT en el hipocampo y bulbo olfatorio en ratas con SM.

Cuantificar la peroxidación lipídica en el bulbo olfatorio e hipocampo en ratas con SM.

Examinar si existen alteraciones en la citoarquitectura neuronal y procesos neurodegenerativos del hipocampo y bulbo olfatorio en ratas con SM.

5. Hipótesis

En ratas con SM inducido por una dieta alta en carbohidratos se observarán alteraciones en el olfato y memoria, así como en la citoarquitectura neuronal y procesos moleculares

involucrados en la vía de la insulina y la patogénesis de la EA, en bulbo olfatorio e hipocampo.

6. Método

Sujetos

Se trabajó con 30 ratas macho de la cepa Wistar, de 250 a 300 g de peso. Estas ratas fueron adquiridas del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. A su llegada, de 3 a 4 ratas se transfirieron a cajas de policarbonato, de dimensiones 43x53x20 cm. Se mantuvieron alojadas en el bioterio de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Tuvieron una fase de habituación de 5 días antes de comenzar con el tratamiento experimental. Se mantuvieron con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad, con una temperatura entre 19 a 22 °C y una humedad relativa de 40-60 %. El manejo de las ratas se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y al reglamento interno del bioterio del INP. Este trabajo pertenece al protocolo aprobado por la Comisión de investigación y por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del INP con número de registro **025/2015**.

Dieta

Después de su aclimatación, se asignaron aleatoriamente a las ratas en dos grupos: el grupo control, que recibió dieta estándar de roedor (Autoclavable Rodent Diet 5010; LabDiet, EE.UU.) y agua al libre acceso (n = 7) y el grupo experimental (n = 17), que recibió la misma dieta estándar y sacarosa diluida en su agua para beber al 30 % para inducir el SM. Ambos grupos se mantuvieron en sus respectivos tratamientos por 23 semanas. Se ha reportado en este modelo de SM que las ratas consumen alrededor de 33.7 mL/día de agua con sacarosa al 30 % y tienen una ingesta total de 89 kcal, frente a las 61.2 kcal de ingesta total de las ratas control (Baños et al., 1997; El Hafidi et al., 2001).

Determinación del SM

En roedores no existe un consenso para determinar el SM. Basado en el criterio para diagnosticar SM en humanos (Alberti et al., 2009), se determinó medir los siguientes

parámetros somatométricos y bioquímicos que representan los parámetros que se encuentran alterados en los humanos con SM.

Peso

A lo largo de las 24 semanas de tratamiento se realizó el registro del peso corporal semanal de las ratas de ambos grupos utilizando una báscula analítica.

Glucosa basal

Tras un ayuno de 5 horas (de 7:00 hrs a 12:00 hrs) se realizó la medición de los niveles de glucosa sanguínea mediante punción de la vena de la cola. Se utilizó un glucómetro y tiras desechables para obtener la medición (FreeStyle Optium; Abbott, EE.UU.).

Triglicéridos

De la misma punción de donde se obtuvo la gota de sangre para la medición de glucosa, se tomó sangre para la medición de niveles de triglicéridos utilizando un equipo portátil y tiras desechables (Accutrend GCT; Roche, EE.UU.).

Insulina basal

Se anestesiaron a las ratas con pentobarbital sódico 100 mg/kg administrado de forma intraperitoneal. Se recolectó sangre mediante punción cardíaca y se realizó la eutanasia por exanguinación. La sangre se centrifugó a 3500 rpm, a 4 °C por 15 minutos para obtener el suero. Se utilizó el kit de ELISA para determinar insulina en ratas (ALPCO, EE.UU.).

HOMA-IR

Con los valores de glucosa e insulina plasmática se obtuvo el índice del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR). Este índice indica el ciclo de retroalimentación entre los niveles glucosa e insulina. Este índice fue desarrollado en humanos (Matthews et al., 1985) y su uso ha sido validado en ratas (L. C. Antunes et al., 2016).

Tejido adiposo

Después de la eutanasia, se recolectó el tejido adiposo visceral de ambos grupos. Se pesó en una balanza analítica. En los resultados se reporta el peso del tejido adiposo normalizado contra el tamaño de la tibia de la rata (g/cm).

Pruebas conductuales

En las semanas 22 y 23 de tratamiento se realizaron las pruebas conductuales de habituación/deshabituación y la prueba del chocolate escondido para evaluar el olfato de las ratas, y la prueba NOR para evaluar la memoria.

Habitación/Deshabituación

El objetivo de esta prueba es evaluar si un roedor es capaz de percibir un olor y distinguir cuando hay un cambio de olor. El procedimiento se llevó a cabo basado en la modificación de un protocolo reportado (Yang & Crawley, 2001). Un día previo a la tarea, se trasladaron a las ratas a la habitación donde se llevarían a cabo las tareas. Se habituó a cada rata en una caja nueva, limpia, con un hisopo sin olor. Al día siguiente, se le presentó a la rata una secuencia sucesiva de diferentes olores. Cada olor fue presentado 3 veces durante 2 minutos, con un intervalo inter-ensayo de 1 minuto. Primero se le presentó un hisopo humedecido en agua (sin olor). Luego, un hisopo con extracto de vainilla (Molina®, México) diluida a una concentración 1:100. Después, un olor social obtenido tras el frotis del hisopo en el fondo de una caja usada por ratas que las ratas evaluadas no conocían. La habituación se define como una disminución progresiva de investigación olfativa hacia la presentación repetida del mismo estímulo olfativo. La deshabituación se considera como el restablecimiento de olfacción cuando un olor novedoso es presentado. Se evaluó el tiempo (en segundos) durante el cual la rata mostraba la conducta olfatoria hacia el hisopo (movimiento de vibras y nariz pegada al hisopo).

Chocolate escondido

El objetivo de esta prueba es determinar si una rata puede percibir un estímulo olfativo. Es un paradigma sencillo en el que se mide la latencia que tarda una rata, que fue sometida a un ayuno nocturno, en encontrar una pieza de comida enterrada en el fondo de su cama. Se

usó el protocolo reportado por Yang & Crawley, 2001. Se le puso a la rata el alimento (chocolate Turín®, tableta de 5 gramos) que sería utilizado en la prueba dos días antes de la evaluación. Se verificó que las ratas hubiesen roído el alimento o hubiesen ingerido el alimento de prueba a la mañana siguiente. Tras un ayuno de una noche, se colocó a la rata en una caja limpia durante 5 minutos. Pasado este tiempo de habituación, se sacó a la rata durante un minuto y se enterró en el aserrín de la caja el chocolate. Se volvió a colocar a la rata en el extremo opuesto donde estaba el chocolate y se cronometró el tiempo que le tomó a la rata descubrir la pieza de comida. Se detenía la prueba si la rata no encontraba el chocolate a los 5 minutos.

NOR

Esta tarea se basa en la naturaleza de los roedores a explorar objetos novedosos. El protocolo utilizado se basó en un estudio previo (M. Antunes & Biala, 2012). La prueba NOR consta de tres fases. En la primera fase, se familiarizó a las ratas a dos objetos totalmente idénticos que estaban colocados dentro de una caja limpia. Se colocó a la rata con el par de objetos durante 10 minutos y se cronometró el tiempo de exploración. Se repitió este ensayo durante 4 veces, con un intervalo entre ensayos de 10 minutos. Al día siguiente, se reemplazó uno de los objetos idénticos por un objeto totalmente diferente. Se limpiaron los objetos con etanol al 70 % al terminar cada ensayo con cada rata. Se cronometró el tiempo de exploración de las ratas hacia los objetos durante todas las fases del experimento.

Eutanasia

Posterior a las pruebas conductuales, se procedió a la eutanasia de las ratas. Se destinó la mitad del número de animales de cada grupo experimental para distintos análisis: 1) la expresión, activación de proteínas y análisis de lipoperoxidación; o 2) análisis histológicos. Se administró una dosis de 100 mg/kg de pentobarbital sódico (PiSA, México) vía intraperitoneal. Una vez determinado que la rata estaba en estado de anestesia profunda (ausencia de reflejos), se extrajo el tejido adiposo y cerebro para el análisis de proteínas y lipoperoxidación. Se aislaron el hipocampo (bilateral) y el bulbo olfatorio (bilateral). Se guardaron en tubos y se congelaron a -50 °C para su almacenamiento y posterior uso. Para

los análisis histológicos, previa anestesia (50 mg/kg de peso; pentobarbital sódico intraperitoneal) se perfundió a las ratas solución salina (250 mL) seguida de paraformaldehído (PFA) al 4 % (250 mL). Se extrajeron los cerebros y se colocaron en PFA y se guardaron a temperatura ambiente (una semana tiempo mínimo). Después se colocaron en una solución de sacarosa al 30 %. Los cerebros se deshidrataron y se embebieron en parafina para su posterior uso.

Extracción de proteínas

Se recuperaron los tejidos congelados (bulbo olfatorio e hipocampo) y se procedió a su homogenización mecánica, mediante el uso de un polytron. Los tejidos estaban suspendidos en una solución de lisis, la cual contenía detergentes para romper las membranas celulares y solubilizar proteínas, un tampón el cual mantiene el pH a niveles fisiológicos y un coctel de enzimas inhibitoras de proteasas y fosfatasa. Se centrifugaron los homogenados a una velocidad de 30000 rpm, a 4°C por 30 minutos. Después de esto, se aisló el sobrenadante que se guardó a -70 °C para su posterior uso.

Cuantificación de proteínas

Se cuantificó la concentración de proteínas en los tejidos homogenados, utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Este es un método de cuantificación colorimétrica en el cual se somete a las muestras a una reacción de reducción junto con un estándar de calibración a diferentes concentraciones (albúmina bovina). Se cargaron 5 µL de homogenado de los cerebros a tubos. Se agregó agua, un detergente (desoxicolato de sodio) y reactivo de Lowry y se dejó reposar 10 minutos. Pasado el tiempo, se agregó el reactivo Folin y se dejó en oscuridad durante 30 minutos. Después se cargaron 200 µL de esta mezcla a una placa de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 580 nm en un espectrofotómetro (Modulus II Microplate, EE.UU.).

Western blot

Después de la cuantificación de las muestras, se cargaron 60 µg de proteínas a geles de poliacrilamida. En un gel se cargaron las muestras de hipocampo y en otro gel muestras de bulbo olfatorio; de ambos grupos. Se hizo una electroforesis bajo las siguientes

condiciones: 90 v por 30 minutos, 150 v por 100 minutos. Después de la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF, en una cámara semihúmeda, a 300 mA por 45 minutos. Pasado este tiempo, se recuperó la membrana y se colocó en solución de bloqueo que contenía leche en polvo al 5 % para reducir el pegado inespecífico de los anticuerpos, durante una hora. Luego se dejaron incubando en el anticuerpo primario una noche. Después de dejar incubando en el anticuerpo secundario otra noche, se incubaron 3 minutos en una solución de luminol y peroxidasa de rábano. Se revelaron las membranas en un sistema de detección de quimioluminiscencia (Chemidoc XRS+; BIO-RAD, EE.UU.). Se hizo un análisis de densitometría de las bandas reconocidas por los anticuerpos utilizando el software Quantity One (BIO-RAD, EE.UU.).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Anti-amyloid precursor protein + beta amyloid antibody (abcam, Reino Unido); anti-bace-1 (abcam, Reino Unido); anti-insulin receptor (phospho Y972) (abcam, Reino Unido); anti-insulin receptor (β -Subunit) (Millipore, EE.UU.); phospho-Akt 1 (ser 473) (Cell signaling, EE.UU.); anti-AKT (BD, EE.UU.) a una dilución de 1:1000 y anti-actin (Sigma, EE.UU.) a una dilución de 1:5000. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-rabbit y anti-mouse IgG, HRP-linked (Cell Signaling, EE.UU.); anti-goat HRP-linked (Santa Cruz, EE.UU.) a una dilución de 1:1000. Todos los anticuerpos fueron suspendidos en una solución con PBS-Tween (0.01 %) más leche en polvo al 3 %.

Determinación de malondialdehído

Se cargaron 200 μ g de proteína a tubos de vidrio. Se trataron con una solución antioxidante y buffer de fosfatos y se calentaron a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, se les agregó ácido acético y ácido tiobarbitúrico y se incubaron a 100 °C por una hora. Se detuvo la reacción dejando las muestras en hielo por 10 minutos. Se adicionó cloruro de potasio y butanol. Se centrifugaron las muestras a 1500 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase orgánica. Después se cargaron 200 μ L de la fase orgánica a una placa de 96 pozos. Se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 513 nm y 553 de emisión usando un espectroscopio (Modulus II Microplate, EE.UU.). La curva de calibración se realizó utilizando el reactivo tetraetoxipropano, el cual recibió el mismo tratamiento que las muestras.

Citoarquitectura y neurodegeneración

Los bloques de cerebros en parafina se procesaron en un microtomo. Se cortaron a un grosor de 20 μm . Se hicieron cortes coronales del hipocampo anterior (bregma: -2.8 mm) y cortes horizontales de la zona media del bulbo olfatorio (interaoral 3.4 mm). Los cortes se montaron en cubre-objetos. Luego se desparafinaron con xilol y etanol a crecientes concentraciones. Se tiñeron las laminillas de cortes cerebrales con dos técnicas: violeta de cresilo para ver cambios en la citoarquitectura y la técnica Fluoro-Jade C para detectar procesos neurodegenerativos.

Violeta de cresilo

Las laminillas fueron sumergidas en solución de violeta de cresilo al 0.1 % durante 15 minutos. Tras varios lavados con agua destilada, se sumergieron en etanol al 70 % para remover el exceso de tinción. Se secaron a temperatura ambiente y se cubrieron con medio de montaje para su posterior uso. La obtención de los cortes histológicos y el procesamiento de esta tinción fueron realizadas amablemente por la colaboración del técnico Pedro Medina Granados del Laboratorio de Biología de la Reproducción. Las imágenes de los cortes fueron tomadas utilizando el microscopio AxioVertA1 (Zeiss, Alemania).

Fluoro-Jade C

Se siguió un protocolo reportado previamente (Gutiérrez et al., 2018). Las laminillas se lavaron con un tampón de fosfatos durante 15 minutos. Luego se sumergieron en solución de Fluoro-Jade C (Histo-Chem Inc., EE.UU.) al 0.001 %. Las laminillas fueron lavadas nuevamente durante 15 minutos en tampón de fosfatos, luego fueron sumergidas en una solución de cloruro de amonio (Sigma) a una concentración de 50 mM. Finalmente, un lavado más en tampón de fosfatos durante 15 minutos. Las laminillas fueron recubiertas con el medio de montaje Fluoroshield con el marcador 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, EE.UU.). Las imágenes se observaron en el microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Japón). El Fluoro Jade-C (pico de excitación 495 nm, pico de emisión 521 nm) fue estimulado con el láser verde para observar marcas de neurodegeneración. El láser violeta fue utilizado para observar los núcleos de las neuronas teñidos con el marcador

DAPI (pico de excitación 358 nm, pico de emisión 461 nm). Se determinó la fluorescencia de las imágenes en el software ImageJ.

Análisis estadístico

Se compararon las medias de los grupos mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney de una cola para las pruebas del chocolate escondido y la prueba de NOR. Para determinar habituación y deshabituación se evaluaron los ensayos intragrupal con el test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

7. Resultados

Parámetros somato-métricos y bioquímicos

La administración de sacarosa en el agua al 30 % durante 24 semanas indujo un incremento significativo de peso, acumulación de grasa visceral y un aumento de triglicéridos en el grupo experimental. Los niveles de glucosa en ayuno no se vieron alterados; en cambio, hubo un aumento significativo en los niveles de insulina del grupo experimental y, por tanto, un mayor puntaje en el parámetro de HOMA-IR (Tabla 1). La alteración de estos parámetros indica que la dieta alta en carbohidratos indujo el SM en las ratas.

Tabla 1. Parámetros morfológicos y bioquímicos a la semana 24 de tratamiento con sacarosa. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$. Media \pm EEM.

	Control	SM
Peso final (g)	601.8 \pm 17.5 n = 7	677.9 \pm 20.2** n = 17
Glucosa (mg/dL)	83.4 \pm 3.4 n = 7	82.53 \pm 4.2 n = 17
Insulina (mU/dL)	2.5 \pm 0.4 n = 4	4.3 \pm 0.6 * n = 9
HOMA-IR	0.56 \pm 0.1 n = 4	1.02 \pm 0.1** n = 9
Triglicéridos (mg/dL)	158.1 \pm 11 n = 7	311.7 \pm 15.8*** n = 17
Tejido adiposo/Tibia (g/cm)	4.08 \pm 0.58 n = 7	7.07 \pm 0.59 ** n = 17

Prueba: Habituaación/Deshabituaación

A lo largo de la exposici3n repetida de los est3mulos olfativos, ambos grupos mostraron una respuesta de habituaaci3n, reflejada por la reducci3n paulatina en los tiempos de exploraci3n. De igual forma, ambos grupos tuvieron un aumento en la exploraci3n ante la presentaci3n de un est3mulo olfativo diferente, lo que demuestra una conducta de deshabituaaci3n (Figura 2A). Los procesos involucrados al desempe1ar esta tarea fueron: detecci3n de un est3mulo olfativo novedoso, disminuci3n de la olfacci3n ante la repetic3n del est3mulo (habituaaci3n) y reconocimiento de un nuevo est3mulo olfativo (deshabituaaci3n). El tratamiento con sacarosa no provoc3 alteraciones en el desempe1o de esta tarea.

Prueba: Chocolate escondido

Tras un ayuno de una noche (se mantuvieron con agua normal ambos grupos), las ratas con SM tuvieron una mayor latencia para encontrar la pieza de chocolate escondida en el aserr3n (Figura 2B). Esta prueba es dependiente del olfato, por lo que una mayor latencia por encontrar la comida escondida indica una falla o retraso en captar la se1al del est3mulo odor3fero y localizar la fuente de 3ste. En conclusi3n, existi3 una alteraci3n en el olfato en las ratas con SM que impidi3 el desempe1o correcto de la tarea.

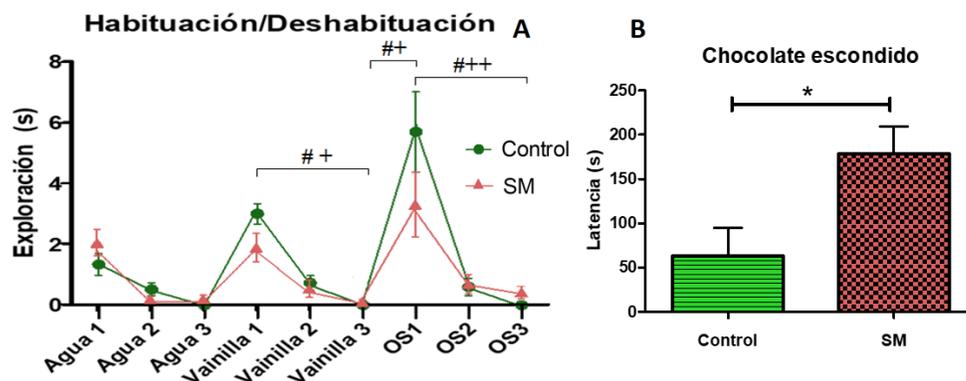


Figura 2. Desempe1o en las pruebas olfativas. **A)** Tiempos de olfacci3n para los diferentes est3mulos olfativos. Cada est3mulo fue presentado durante dos minutos por tres ensayos, con un intervalo inter-ensayo de un minuto. An3lisis intragrupal # $p \leq 0.01$ Control; + $p \leq 0.01$ SM; ++ $p \leq 0.001$ Control $n = 7$, SM $n = 17$. Media \pm EEM. **B)** Promedio de latencia en el cual las ratas desenterraban el pellet escondido. * $p \leq 0.05$. Control $n = 7$, SM $n = 17$. Media \pm EEM.

Prueba: NOR

Para determinar el efecto del SM sobre la memoria en ratas se realizó la prueba NOR. En la fase de prueba, 24 horas después de la presentación de los objetos idénticos, se colocaron a las ratas frente al objeto familiar y frente a un objeto totalmente novedoso. Ambos grupos tuvieron mayor preferencia a explorar el objeto novedoso que el objeto familiar (Figura 3). Sin embargo, el grupo de SM tuvo un menor tiempo de exploración en la fase de prueba. Pese a esto, existe una diferencia significativa entre el tiempo que pasaron explorando el objeto novedoso frente al familiar. Esta eficiencia al realizar la tarea indica que el SM tuvo un efecto benéfico sobre el desempeño en esta prueba de memoria.

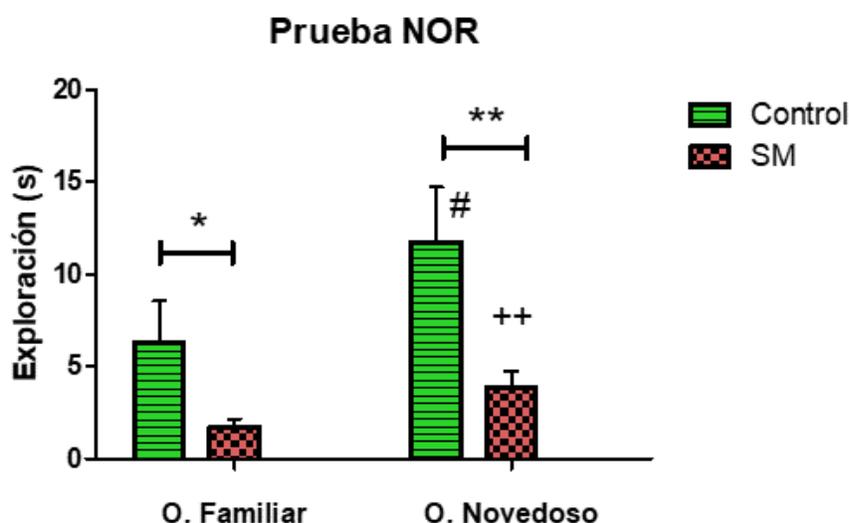


Figura 3. Tiempos de exploración hacia el objeto familiar y el objeto novedoso. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; # $p \leq 0.05$ Control O. Novedoso vs O. Familiar; ++ $p \leq 0.01$ SM O. Novedoso vs O. Familiar. Control $n = 7$, SM $n = 17$. Media \pm EEM.

Expresión de APP y BACE-1; activación de receptor a insulina y AKT en el hipocampo

Se evaluó en el hipocampo la expresión de la proteína APP y de la enzima la BACE-1. El grupo de SM tuvo una menor expresión de la APP y no se encontraron diferencias en la expresión de la BACE-1 (Figura 4). Las proteínas que participan en la vía de señalización de la insulina tuvieron una mayor activación, medida por los mayores niveles de fosforilación del receptor a insulina y de AKT. La hiperactivación de la vía de la insulina en el hipocampo puede deberse a que responde a la hiperinsulinemia sistémica presente en las ratas con SM.

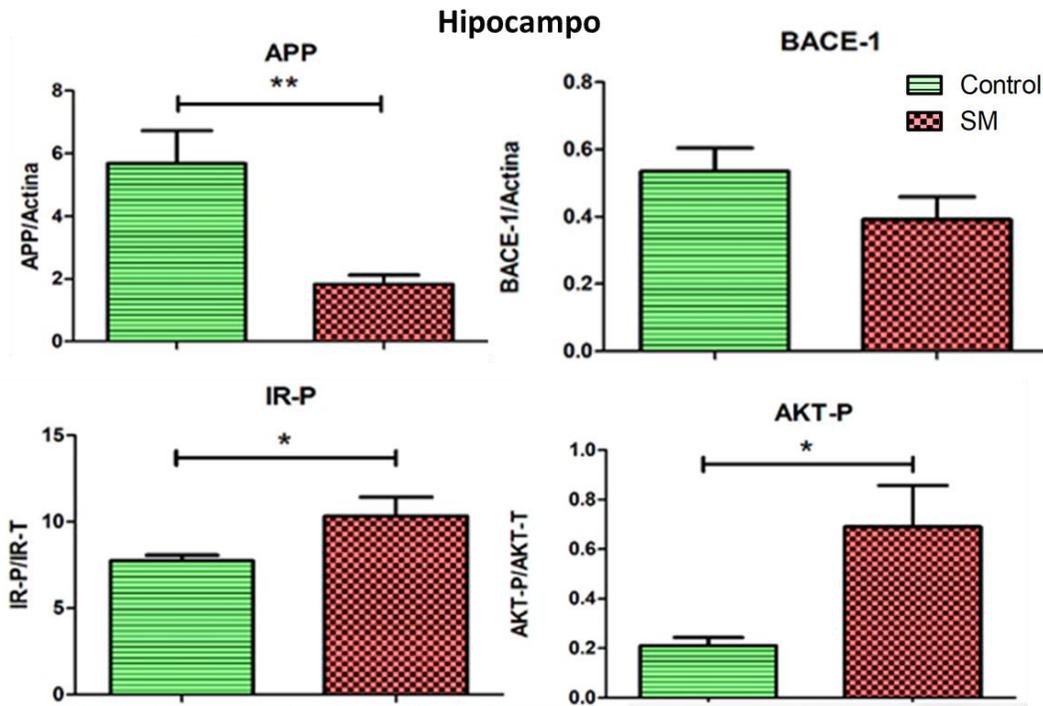


Figura 4. Análisis por Western Blot de las proteínas APP, BACE-1, IR-P, IR-T, AKT-P, AKT-T. Control n=5, SM n=7. * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Control vs SM.

Expresión de APP, BACE-1 y activación de receptor a insulina y AKT en el bulbo olfatorio

Se evaluó en el bulbo olfatorio la expresión de la proteína APP y de la enzima BACE. La presencia de SM no indujo cambios en los niveles de expresión de estas proteínas. También, la vía de la insulina permaneció sin cambios, puesto que los niveles de fosforilación del receptor a insulina y de AKT fueron similares a los del grupo control (Figura 5). Cabe señalar que este resultado se antepone a lo ocurrido en el hipocampo usando los mismos animales. Este resultado sugiere que existe una resistencia a la insulina en el bulbo olfatorio; ya que a pesar de haber hiperinsulinemia sistémica, no hay una mayor activación de la vía de la insulina en esta zona.

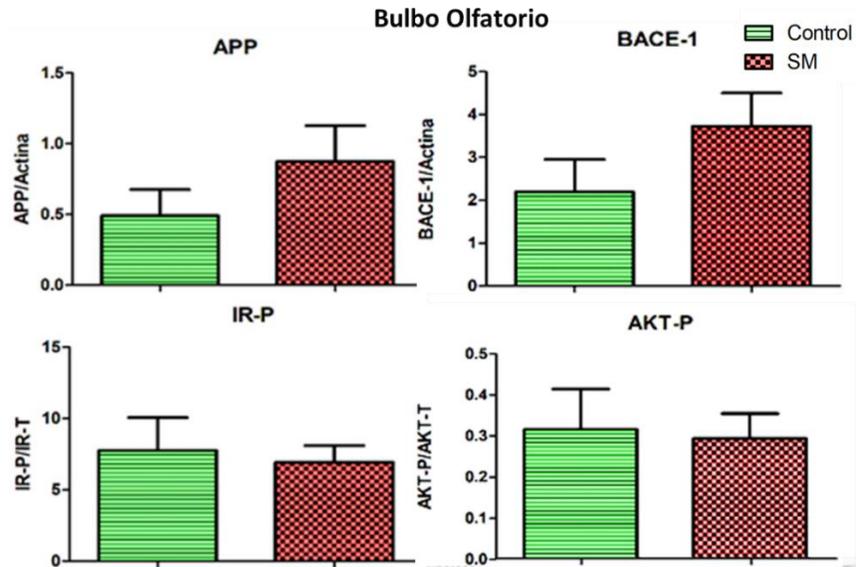


Figura 5. Análisis por Western Blot de las proteínas APP, BACE-1, IR-P, IR-T, AKT-P, AKT-T. Control n=5, SM n=7. Media \pm EEM.

Niveles de MDA en hipocampo y bulbo olfatorio

Se determinó la presencia de estrés oxidante mediante la medición del marcador MDA, un producto generado por la oxidación de lípidos. De forma interesante, el hipocampo de las ratas con SM tuvo menores niveles de MDA (Figura 6). En el bulbo olfatorio no se encontraron diferencias. Esto podría ser resultado de un estado de compensación de las moléculas antioxidantes frente a la presencia de SM.

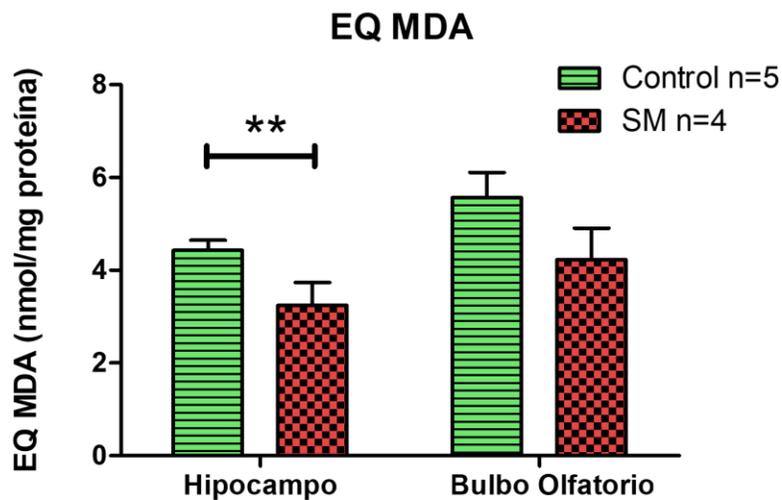


Figura 6. Análisis de determinación de MDA. ** $p \leq 0.001$. Media \pm EEM.

Citoarquitectura neuronal del hipocampo y bulbo olfatorio

Se observaron los cortes teñidos con la solución de violeta de cresilo para analizar de forma general cambios en la citoarquitectura de las neuronas del hipocampo y del bulbo olfatorio (sin dispersión de las neuronas de CA1, CA2, CA3 ni giro dentado; sin cambios en la organización laminar ni glomerular del bulbo olfatorio). No se encontraron cambios entre los grupos en estos parámetros (Anexo 4).

Marcaje de neurodegeneración en hipocampo y bulbo olfatorio

Se investigó si el tratamiento para inducir SM podría generar neurodegeneración en el hipocampo y bulbo olfatorio de las ratas. No se encontraron diferencias significativas en la señal de fluorescencia entre los grupos en el hipocampo ni bulbo olfatorio (Figura 7). Se observó una gran dispersión de los datos debido al número de cortes analizados, ya que los demás tejidos sufrieron daños al momento de ser fijados.

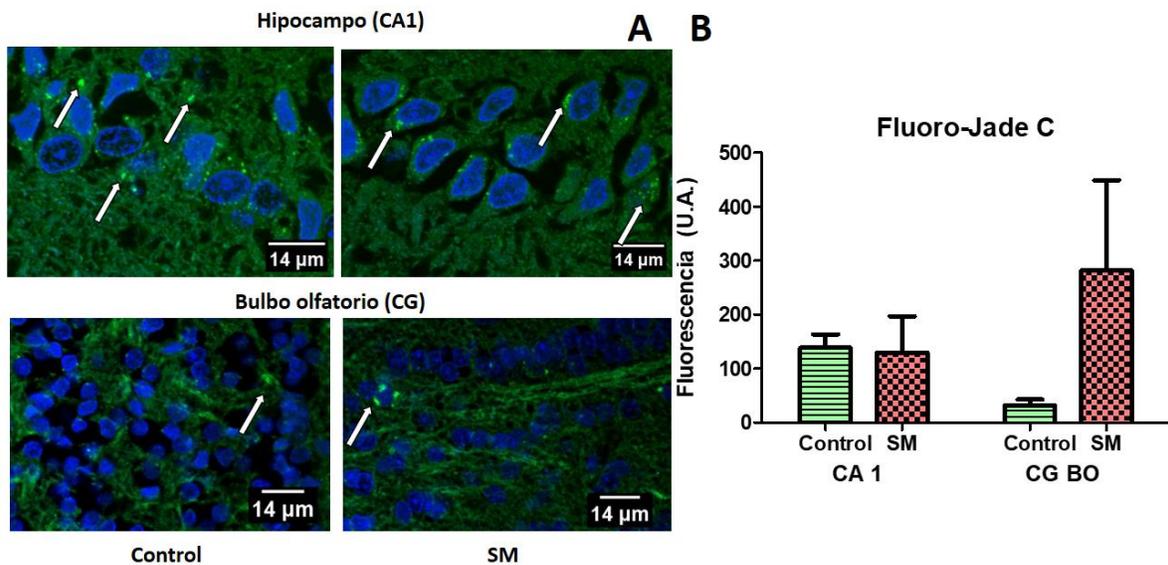


Figura 7. Determinación de neurodegeneración con la técnica Fluoro-Jade C. **A)** Imágenes representativas de los cortes analizados: región del CA1 del hipocampo y la región de las células granulares del bulbo olfatorio. Las flechas blancas señalan las marcas de neurodegeneración detectas mediante esta tinción. Control n = 2, SM n = 3. **B)** Cuantificación de la fluorescencia emitida. No hubo diferencias significativas. BO CG: bulbo olfatorio células granulares.

8. Discusión

Parámetros somato-métricos y bioquímicos

El tratamiento con sacarosa al 30 % durante 24 semanas indujo alteraciones en los parámetros comúnmente medidos para determinar el SM en humanos. Tal como fue revisado por Rodríguez-Correa et al., 2020, dependiendo del tipo de nutrimento utilizado para inducir SM se obtienen alteraciones más o menos severas en los parámetros bioquímicos. Cabe resaltar que los autores encuentran que alrededor del 30 % de artículos que utilizaron dietas altas en carbohidratos reportan cambios en el peso corporal de las ratas, en cambio un 86 % reporta un aumento en la grasa visceral. A pesar de que en esta investigación el grupo con SM tuvo un peso corporal mayor (siendo éste un aumento del 12 % comparado con el peso final del grupo control), también hubo un incremento significativo en la grasa corporal, siendo éste un mejor indicador de obesidad en modelos animales (tabla 1).

En la misma revisión de Rodríguez-Correa, se reporta que dietas altas en grasas y dietas de cafetería (altas en azúcares y grasas) alteran los niveles plasmáticos de glucosa, haciendo a las ratas hiperglucémicas. El impacto de estas dietas sobre la glucosa y otros parámetros metabólicos es tan severo que se observan las alteraciones características del SM tras pocas semanas de tratamiento. En cambio, utilizando dietas altas en carbohidratos es posible observar alteraciones similares del SM en donde los niveles de glucosa permanecen sin cambios, pero se presenta un estado de hiperinsulinemia para regular la ingesta extra de carbohidratos que proporciona la dieta. Esto fue replicado en nuestro modelo, donde tras recibir sacarosa al 30% durante 23 semanas, se presentó un estado de hiperinsulinemia pero los niveles de glucosa circulantes permanecieron sin cambios.

Pruebas olfativas

Como se mencionó anteriormente, existen alteraciones en diferentes componentes de la función olfativa décadas antes del declive de la memoria y del comienzo del deterioro cognitivo leve o la presencia de demencia, como la EA. Por su temporalidad, la disfunción olfativa se propone como un biomarcador temprano de demencias. Investigaciones clínicas indican que existen también alteraciones en el olfato en pacientes con SM. Por este motivo, se decidió evaluar si tales alteraciones están presentes en el modelo de SM inducido por una dieta alta en carbohidratos.

En la prueba de habituación/deshabituación hacia estímulos olfativos, el grupo con SM desempeñó la tarea de forma adecuada, exhibiendo habituación a un mismo estímulo olfativo y deshabituación a un estímulo diferente. Esta tarea no pudo determinar fallas en el olfato en este grupo.

En cambio, en la prueba del chocolate escondido, en donde las ratas tenían que encontrar un pedazo de comida escondida guiados por su olfato, el grupo de SM tuvo una mayor latencia para encontrar la comida enterrada. Esto puede ser indicador de una falla en la percepción de olores, aunque este resultado queda por confirmarse mediante la evaluación de otras tareas o con la medición de potenciales evocados olfatorios. La función de esta tarea es evaluar el olfato mediado por una motivación por el ayuno de una noche, ya que ambos grupos se sometieron al ayuno por el mismo período de tiempo por lo que el resultado obtenido es debido a diferencias en el olfato. En cambio, la tarea de habituación/deshabituación conlleva un componente de memoria de “corto plazo”, ya que esto permite la habituación a los estímulos olfativos.

Se ha reportado que ratas diabéticas tienen problemas ante la habituación (Lietzau et al., 2018) y deshabituación (Rivière et al., 2016), tuvieron menos tiempo de exploración ante los estímulos olfativos y tardaron más tiempo en encontrar el chocolate escondido. Se concluyó que la DMT2 tiene un efecto negativo sobre la detección de olores y sobre la memoria olfativa. El modelo utilizado se caracterizó por un estado de hiperglucemia, anteponiéndose a las características de las ratas utilizadas en este proyecto, en donde no existe hiperglucemia, pero sí un estado de hiperinsulinemia sistémica. Por este motivo, nuestra investigación brinda conocimiento novedoso sobre la presencia de alteraciones en la función olfativa en un modelo de síndrome metabólico previo a las alteraciones sobre la captación de la glucosa y la presencia de DMT2.

Prueba NOR

Existe un amplio número de tareas que evalúan la memoria en roedores. El más utilizado en modelos de neurodegeneración es el laberinto acuático de Morris, en el cual se evalúa la memoria espacial. Sin embargo, se optó no utilizar esta prueba debido al estrés que ejerce esta tarea sobre las ratas. Por otra parte, la prueba NOR se basa en la habilidad innata de los roedores por explorar los estímulos novedosos que son presentados en su ambiente.

De manera interesante, el SM no causó una alteración en el desempeño de esta tarea, puesto que las ratas prefirieron explorar el estímulo novedoso frente al estímulo familiar. Sin embargo, las ratas con SM tuvieron menores tiempos de exploración tanto en la fase de familiarización (Anexo 3) como en la fase de prueba. Estudios realizados en ratas sanas demostraron una correlación entre el menor tiempo de exploración en la fase de familiarización y una mayor preferencia ante el objeto novedoso (Broadbent et al., 2010). Esta evidencia parece indicar que las ratas con SM tuvieron una mayor efectividad en memorizar las características de los objetos similares en la primera fase y por tanto una mejor capacidad a la hora de identificar el objeto novedoso en la fase de prueba.

Los resultados en la prueba de NOR de esta investigación se antepone con lo que se ha reportado por otros grupos de investigación (Anexo 2) utilizando un modelo similar de SM inducido por sacarosa diluida. En el experimento realizado por Beilharz et al., 2014, la administración de sacarosa diluida al 10 % durante 3 semanas no tuvo efecto sobre el desempeño en la prueba NOR, pero disminuyó el reconocimiento de la localización novedosa de un objeto. En cambio, Buyukuta y colaboradores, 2018, reportaron en el mismo modelo de SM, pero extendiendo el tratamiento por 8 semanas, una disminución del desempeño en la prueba NOR. Esta diferencia se debió a que en la prueba NOR realizada por Buyukuta, los objetos en la fase de prueba compartían algunas características físicas similares (altura y color), por lo que era más complicado para las ratas discernir entre el objeto familiar y el novedoso.

Incrementando el tiempo de tratamiento para inducir SM pareciera tener un efecto sobre el desempeño de la prueba NOR. También, incrementando el porcentaje de sacarosa diluida parece tener un efecto negativo en la memoria, tal como lo reportó Lemos et al., 2016, tras un tratamiento de sacarosa al 35 % durante 10 semanas encontró un peor desempeño sobre las tareas NOR y reconocimiento de lugar novedoso. Este efecto sobre la memoria fue acompañado de una menor conducción electrofisiológica en la vía temporoamónica. Al ser éste un modelo similar al utilizado en nuestra investigación, se esperaban resultados similares sobre la prueba NOR. Sin embargo, la participación del hipocampo sobre la prueba NOR es controvertida lo que puede explicar el por qué no se hayan encontrado alteraciones en el desempeño de la prueba NOR.

Estudios previos han reportado una relación entre desórdenes del ánimo y alteraciones metabólicas. En particular, conductas de ansiedad y depresión se observan en roedores que tienen deleción del receptor de insulina en el hipotálamo. De igual forma, manifestaciones de ansiedad y anhedonia se observa en animales alimentados con una dieta alta en grasas (Lee et al., 2016). A pesar de que el modelo de SM utilizado en esta investigación no produce alteraciones tan severas como las dietas altas en grasas, no se puede descartar que conductas de ansiedad pudieran haber influido en los resultados de esta investigación, ya que no se hicieron pruebas para confirmar o descartar este supuesto. Otros grupos de investigación no reportaron evidencia de ansiedad en las ratas alimentadas con sacarosa (Flores-Fuentes et al., 2021). Sin embargo, manifestaciones de ansiedad en nuestras ratas pudieron haber generado desinterés o neofobia hacia la exploración de los estímulos olfativos y de los objetos utilizados en la prueba de memoria.

Análisis de activación y expresión de proteínas

Debido a la influencia de la señalización de la insulina en el procesamiento amiloidogénico de la APP, se decidió investigar las principales proteínas involucradas en estas vías. El objetivo fue determinar si el modelo de SM inducido por una dieta alta en carbohidratos podría alterar la vía de señalización de la insulina en bulbo olfatorio e hipocampo y si esta alteración influía en los niveles de expresión de la APP y de la enzima BACE-1.

Se encontraron resultados diferenciales en este experimento: en el hipocampo, hubo una menor expresión de la APP, no hubo efectos sobre la expresión de la enzima BACE-1; y una mayor actividad del receptor a insulina y de una de sus proteínas blanco río abajo, la proteína AKT. La mayor actividad del receptor a insulina y de la AKT corresponderían al estado de hiperinsulinemia al que están sometidas las ratas con SM. Esto parece indicar que, a pesar de haber resistencia a la insulina sistémica, el hipocampo parece ser sensible a los altos niveles de insulina y, por tanto, eso explicaría los altos niveles de activación de la vía de la insulina. A pesar de no haberse realizado un experimento que demuestre una relación causal, y por estudios previos realizados por Pandini et al., 2013, se propone una correlación entre el incremento de la actividad de la vía de la insulina y una disminución de la expresión de la APP.

En cambio, en el bulbo olfatorio, no se encontraron diferencias entre la actividad del receptor a insulina y de la proteína AKT, ni en los niveles de expresión de la APP y de la BACE-1. Una posible explicación es que el bulbo olfatorio presenta resistencia a la insulina ya que a pesar de haber hiperinsulinemia sistémica, no se observa una mayor activación de esta vía en esta área del cerebro. Investigaciones previas apoyan esta hipótesis, ya que se ha reportado que existen muy bajos niveles de insulina en el bulbo olfatorio e hipotálamo de ratas Zucker genéticamente obesas a pesar de tener hiperinsulinemia sistémica (Baskin et al., 1985). Queda por determinar si existen alteraciones tempranas en el bulbo olfatorio u otras partes de la vía olfativa (como epitelio olfatorio, corteza piriforme o corteza entorrinal).

Lipoperoxidación

La presencia de EO en demencias, como la EA, está muy documentada. Por ejemplo, se ha reportado que tras una administración intracerebroventricular de péptidos β A se presentan alteraciones en la conducta olfativa y una presencia de EO en el bulbo olfatorio (Raj et al., 2019). De igual forma, se sabe que el EO es una de las patologías centrales de la obesidad y el SM (Luque-Contreras et al., 2014). En nuestro estudio, el tratamiento de sacarosa al 30 % durante 23 semanas provocó una disminución de los niveles de lipoperoxidación (observado por los niveles de MDA) en el hipocampo de las ratas con SM y una tendencia a una disminución de estos niveles en el bulbo olfatorio.

Dado que este modelo de inducción de SM produce alteraciones tempranas en el metabolismo energético, moléculas antioxidantes podrían estar incrementadas en su expresión o en su actividad, lo que genere este estado compensatorio de una disminución en la lipoperoxidación. Sin embargo, este trabajo brinda evidencia del estado de lipoperoxidación en el bulbo olfatorio e hipocampo en un modelo de SM inducido por una dieta alta en carbohidratos.

Resultados histológicos

La vía de la insulina está involucrada en la supervivencia y crecimiento de las células, entre otros mecanismos, a través de diferentes proteínas río abajo entre ellas la proteína AKT (Manning & Toker, 2017). Esta acción en el SNC es de particular importancia, ya que participa en la formación dendrítica, mantenimiento de la transmisión sináptica y supervivencia neuronal (Banks, Owen & Erickson, 2012). Por este motivo, se exploró si en el modelo utilizado de SM existirían alteraciones morfológicas y procesos neurodegenerativos en el hipocampo y bulbo olfatorio.

Utilizando la técnica de violeta de cresilo no se observaron cambios en la citoarquitectura ni en la organización de las neuronas del hipocampo ni del bulbo olfatorio (Anexo 4). Este resultado fue esperado puesto que un estudio previo (Faizal & Khan, 2017) encontró alteraciones en la histomorfología del bulbo olfatorio en ratas diabéticas, en las que el estado prolongado de hiperglicemia generó alteraciones en la estructura y organización de las neuronas del bulbo olfatorio. Sin embargo, en nuestro modelo tales alteraciones no están presentes. Por lo que se concluye que en este modelo de SM no induce alteraciones en la morfología neuronal.

Por último, para poder estudiar si un daño estructural estaba ocurriendo y que explicara la alteración en el olfato en ratas con SM, se evaluó la neurodegeneración en el hipocampo y bulbo olfatorio. A pesar de no haber un consenso sobre cuál es el marcador que reconoce la técnica de Fluoro-Jade C, se ha propuesto que sea debido al reconocimiento de proteínas procesadas proteolíticamente, que estén asociadas a los microfilamentos o a los micro-túbulos de las neuronas, como la proteína tau (Schmued, et al., 2005). Debido a la gran dispersión que arrojó nuestro análisis, no se encontraron diferencias significativas entre la señal emitida por la tinción en el hipocampo ni en bulbo olfatorio (Figura 7).

En un modelo de EA se encontró procesos de apoptosis en las neuronas sensoriales olfativas del epitelio olfatorio y alteraciones en la función olfativa, incluso antes de observarse depósitos de placas neuríticas (Cheng, Cai, & Belluscio, 2011). En nuestra investigación, no se encontraron diferencias en la señal dada por la tinción de Fluoro-Jade C en el bulbo olfatorio. Se tendrá en cuenta el ampliar el número de cortes en análisis futuros y determinar si: disminuye la dispersión de los datos; y si existen procesos neurodegenerativos en el bulbo olfatorio en el modelo de SM inducido por una dieta alta en

carbohidratos, que puedan explicar las alteraciones en el olfato encontradas en esta investigación.

9. Conclusión

El análisis de los efectos del SM, inducido por una dieta alta en carbohidratos, arrojó lo siguiente: una falla en realizar una prueba olfativa (chocolate escondido), no generó cambios a nivel celular, no hubo cambios en la distribución de las neuronas en bulbo olfatorio ni hipocampo, ni se detectó una señal significativa de muerte neuronal; y generó alteraciones diferenciales en diferentes zonas del cerebro: hiperactivación de la vía de insulina en el hipocampo (Figura 8A), pero no en el bulbo olfatorio (Figura 8B).

La influencia de las alteraciones del metabolismo energético sobre las funciones cognitivas es un área de investigación que se debe abordar desde la psicobiología, ya que nuestro país ocupa los primeros lugares en el mundo en prevalencia de obesidad y SM. Por lo tanto, el estudio de estos elementos generará más conocimiento acerca de su interrelación y posibles estrategias terapéuticas.

9.1 Limitaciones y perspectivas

La evaluación de la memoria mediante una prueba única no permitió indagar más acerca del estado de la memoria en el grupo experimental. También, dada la participación de la insulina ante alteraciones en el estado de ánimo, no se puede descartar con totalidad que la diferencia observada en la prueba del chocolate escondido haya sido debido a la influencia de la ansiedad, motivación, falta de hambre y otros factores en el grupo experimental. Por último, el menor número de sujetos en el grupo control condicionó el poder realizar un mejor análisis en la técnica de Fluoro-Jade C, ya que se destinaron menor número de cerebros para este experimento a comparación del grupo experimental.

Dentro de las perspectivas tenemos que: se necesita determinar el desempeño de la memoria a través de otras tareas, como el laberinto de Barnes o la prueba de reconocimiento de localización novedosa, ya que las pruebas que evalúan memoria espacial son más sensibles en evaluar la integridad del hipocampo; realizar pruebas que permitan medir conductas de ansiedad para descartar su influencia sobre los resultados conductuales; cuantificar la actividad de la enzima BACE-1 y de las enzimas involucradas en el sistema

de defensa antioxidante como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, entre otras; y analizar si la falla en el olfato se ve respaldada por una deficiencia en la conducción sináptica (Figura 8).

Se necesita estudiar la influencia de otras alteraciones del SM sobre la patogénesis de la EA. Por ejemplo, se sabe que un estado proinflamatorio crónico tiene una influencia sobre la sensibilidad a la insulina, siendo una característica que comparten tanto el SM como la EA (Kullmann et al., 2016). De igual forma, se ha descrito un perfil alterado en la composición de la microbiota (disbiosis) intestinal en pacientes con EA, (Zhuang et al., 2018). En línea con lo anterior, recientemente se ha descrito mecanismos causales entre la disbiosis intestinal y el procesamiento de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares, mediado por procesos inflamatorios (Chen et al., 2020). Se sugiere que se determine el efecto de modelos de SM sobre el procesamiento de la proteína tau en el bulbo olfatorio, puesto que su procesamiento también está influenciado en parte por la vía de señalización de la insulina, por medio del control de la activación de la GSK-3 β . Finalmente, nuestro modelo exhibió dislipidemias, las cuales también se asocian con el progreso de la EA (Reitz, 2013).

La administración de sacarosa para inducir SM asemeja la ingesta de bebidas hipercalóricas (como jugos y refrescos) en humanos (Gutierrez, Fonseca, & Simon, 2020). Sin embargo, las dietas de cafetería (aquellas que son altas en carbohidratos y grasas) son las que mejor moldean el consumo de dietas obesogénicas en los humanos. Sus propiedades altamente palatables e hipercalóricas generan un incremento en la ganancia de peso y obesidad, SM, síntomas severos de diabetes, inflamación del hígado y otras desregulaciones metabólicas (Lalanza & Snoeren, 2021) en menores tiempos de administración, comparada con las dietas altas en carbohidratos (Rodríguez-Correa et al., 2020). Sin embargo, depende de las preguntas de investigación para decidir qué modelo de SM utilizar. En este estudio se usó una dieta alta en carbohidratos porque modela fases tempranas del SM. Se buscó determinar si existe daño prematuro en la función olfativa, que pueda ser predictor de procesos neurodegenerativos, como los que ocurren en la EA. No obstante, al modelar alteraciones tempranas, se observaron respuestas compensatorias en la vía de la insulina y en los niveles de MDA.

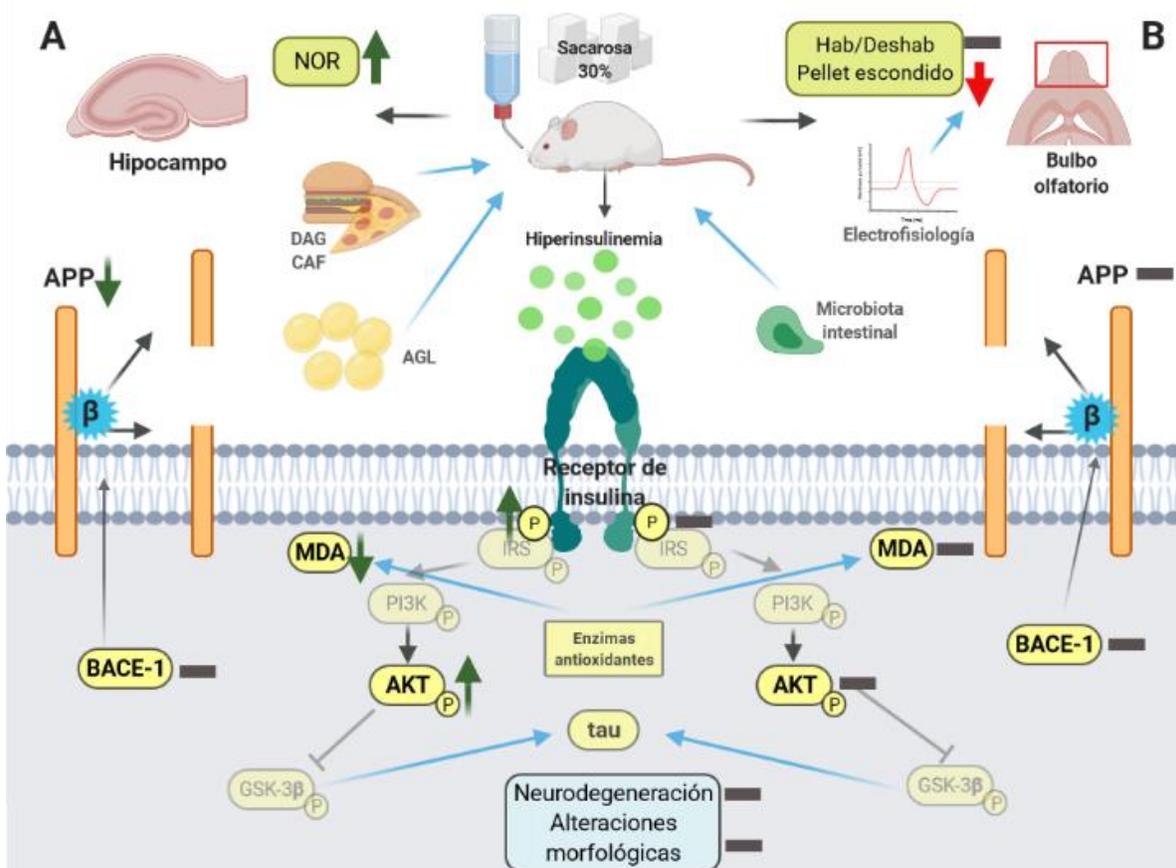


Figura 8. Esquema que ilustra de forma resumida los resultados de este proyecto tanto en **A)** hipocampo, como en **B)** bulbo olfatorio. Las flechas rojas y verdes indican una diferencia significativa contra el grupo control. Las barras grises indican que no hubo cambios. Las flechas azules señalan las perspectivas del proyecto. Creada con biorender.com.

10. Referencias

- Abbott, A., & Dolgin, E. (2016, noviembre 23). Failed Alzheimer's trial does not kill leading theory of disease. *Nature*, Vol. 540, pp. 15–16.
<https://doi.org/10.1038/nature.2016.21045>
- Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., ... Smith, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International. *Circulation*, 120(16), 1640–1645.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- Antunes, L. C., Elkfury, J. L., Jornada, M. N., Foletto, K. C., & Bertoluci, M. C. (2016). Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 60(2), 138–142.
<https://doi.org/10.1590/2359-3997000000169>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110.
<https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H. Y., Ahima, R. S., ... Nathan, D. M. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: Concepts and conundrums. *Nature Reviews Neurology*, 14(3), 168–181. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185>
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 263–293.
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology and Therapeutics*, 136(1), 82–93.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.006>
- Baños, G., Carvajal, K., Cardoso, G., Zamora, J., & Franco, M. (1997). Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *American Journal of Hypertension*, 10(4 I), 379–388. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(96\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(96)00400-1)

- Barbosa, K. B. F., Bressan, J., Zulet, M. A., & Martínez Hernández, J. A. (2008). Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, *31*(3), 259–280. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272008000500006>
- Baskin, D. G., Stein, L. J., Ikeda, H., Woods, S. C., Figlewicz, D. P., Porte, D., ... Dorsa, D. M. (1985). Genetically obese zucker rats have abnormally low brain insulin content. *Life Sciences*, *36*(7), 627–633. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90166-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90166-3)
- Bateman, A. (2019). UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *37*, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.016>
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2015). Diet-induced cognitive deficits: The role of fat and sugar, potential mechanisms and nutritional interventions. *Nutrients*, *7*(8), 6719–6738. <https://doi.org/10.3390/nu7085307>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, *368*(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bokura, H., Yamaguchi, S., Iijima, K., Nagai, A., & Oguro, H. (2008). Metabolic Syndrome Is Associated With Silent Ischemic Brain Lesions. *Stroke*, *39*(5), 1607–1609. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.508630>
- Brauna, S., Bitton-Worms, K., & le Roith, D. (2011). The link between the metabolic syndrome and cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *7*(7), 1003–1015. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1003>
- Broadbent, N. J., Gaskin, S., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, *17*(1), 5–11. <https://doi.org/10.1101/lm.1650110>
- Buyukata, C., Vukalo, M., Xu, T. J., Khore, M. A., & Reichelt, A. C. (2018). Impact of high sucrose diets on the discrimination of spatial and object memories with overlapping features. *Physiology and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.027>

- Callahan, P. M., & Terry, A. V. (2018). Nicotinic Receptor Ligands and Novel Object Recognition. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 27(1), 379–390.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00026-4>
- Cao, D., Lu, H., Lewis, T. L., & Li, N. (2007). Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36275–36282. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703561200>
- Carroll, J. (2017). Another Alzheimer’s drug flops in pivotal clinical trial. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.aal0759>
- Carvajal, K. G., Camacho C., L., Phillips F., B., & Martínez A., M. (2017). Modelos animales de síndrome metabólico y diabetes. En S. Machado, N. Barbosa, A. Barciela, H. Budde, & E. Murillo-Rodríguez (Eds.), *Temas selectos en neurobiología molecular e integrativa* (1ra Ed, p. 298). Ciudad de Mexico: Anáhuac Mayab.
- Cassano, T., Romano, A., Macheda, T., Colangeli, R., Cimmino, C. S., Petrella, A., ... Gaetani, S. (2011). Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease. *Behavioural Brain Research*, 224(2), 408–412.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.029>
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease. *Redox Biology*, 14(October 2017), 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chen, C., Ahn, E. H., Kang, S. S., Liu, X., Alam, A., & Ye, K. (2020). *Gut dysbiosis contributes to amyloid pathology , associated with C / EBP □ / AEP signaling activation in Alzheimer ’ s disease mouse model*. (July), 1–16.
- Cheng, N., Cai, H., & Belluscio, L. (2011). In vivo olfactory model of app-induced neurodegeneration reveals a reversible cell-autonomous function. *Journal of Neuroscience*, 31(39), 13699–13704. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1714-11.2011>
- Consejo Nacional de Población (CONAPO). (2016). *Cuadernillos estatales de las Proyecciones de la Población de México y de las Entidades Federativas, 2016-2050*. 68. Recuperado de file:///D:/TRABAJO/Documentación/PROYECCIONES DE LA POBLACIÓN DE MÉXICO Y DE LAS ENTIDADES FEDERATIVAS.pdf

- Cordner, Z. A., & Tamashiro, K. L. K. (2015). Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiology & Behavior*, *152*, 363–371.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.008>
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes—Evidence Reviewed. *Journal of Diabetes Science and Technology*, *2*(6), 1101–1113.
- Devanand, D. P. (2016). Olfactory Identification Deficits, Cognitive Decline, and Dementia in Older Adults. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, *24*(12), 1151–1157.
<https://doi.org/10.1016/j.jagp.2016.08.010>
- Devi, L., Alldred, M. J., Ginsberg, S. D., & Ohno, M. (2012). Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of β -amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, *7*(3), 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032792>
- Dintica, C. S., Marseglia, A., Rizzuto, D., Wang, R., Seubert, J., Arfanakis, K., ... Xu, W. (2019). Impaired olfaction is associated with cognitive decline and neurodegeneration in the brain. *Neurology*, *92*(7), E700–E709.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006919>
- Dolgin, E. (2016). How to defeat dementia. *Nature*, *539*(7628), 156–158.
<https://doi.org/10.1038/539156a>
- El Hafidi, M., Cuéllar, a, Ramírez, J., & Baños, G. (2001). Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities. *The Journal of nutritional biochemistry*, *12*, 396–403.
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00154-1)
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). (2019). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 Presentación de resultados*.
- Faizal, M., & Khan, A. A. (2017). A Histomorphological Study on the Olfactory Bulb of Diabetic Albino Rats. *3*(4), 47–56. <https://doi.org/10.11648/j.ijcems.20170304.12>
- Fernandez, A. M., & Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(4), 225–239.
<https://doi.org/10.1038/nrn3209>
- Flores-Fuentes, N., Hernandez-Cruz, C., Bermeo, K., Barajas-Martinez, A., Hernandez-Serratos, V. N., Aceves-Rodriguez, E. M., ... Garcia, D. E. (2021). Motor learning

- impairment in rats under a high sucrose diet. *Physiology and Behavior*, 234(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113384>
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70(1), 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- Ghanbari, H. A., Ghanbari, K., Harris, P. L. R., Jones, P. K., Kubat, Z., Castellani, R. J., ... Perry, G. (2004). Oxidative damage in cultured human olfactory neurons from Alzheimer's disease patients. *Aging Cell*, 3(1), 41–44. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00083.x>
- Gladding, J. M., Abbott, K. N., Antoniadis, C. P., Stuart, A., & Begg, D. P. (2018). The Effect of Intrahippocampal Insulin Infusion on Spatial Cognitive Function and Markers of Neuroinflammation in Diet-induced Obesity. *Frontiers in Endocrinology*, 9(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00752>
- Gutierrez-Robledo, L. M., & Arrieta-Cruz, I. (2015). [Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer s Plan]. Demencias en México: la necesidad de un Plan de Acción. *Gaceta medica de Mexico*, 151(5), 667–673. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526483>
- Gutiérrez, I. L., González-Prieto, M., García-Bueno, B., Caso, J. R., Leza, J. C., & Madrigal, J. L. M. (2018). Alternative Method to Detect Neuronal Degeneration and Amyloid β Accumulation in Free-Floating Brain Sections With Fluoro-Jade. *ASN Neuro*, 10. <https://doi.org/10.1177/1759091418784357>
- Gutierrez, R., Fonseca, E., & Simon, S. A. (2020). The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. En *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03458-2>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256, 184–185.
- Hawkes, C. (2006). Olfaction in neurodegenerative disorder. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, 63(4), 133–151. <https://doi.org/10.1159/000093759>
- Huang. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 2(5–6), 231–237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- Huang, W. J., Zhang, X., & Chen, W. W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's

- disease (review). *Biomedical Reports*, 4(5), 519–522.
<https://doi.org/10.3892/br.2016.630>
- Hung, C. S., Lee, J. K., Yang, C. Y., Hsieh, H. R., Ma, W. Y., Lin, M. S., ... Li, H. Y. (2014). Measurement of visceral Fat: Should we include Retroperitoneal Fat? *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112355>
- International Diabetes Federation (IDF). (2005). Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. *Epidemiology and Prevention*, 50(3), 514211. Recuperado de <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>
- Jahn, H. (2013). Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 15, 445–454. <https://doi.org/10.5860/choice.51-5528>
- Jensen, M., & De Meyts, P. (2009). Molecular Mechanisms of Differential Intracellular Signaling From the Insulin Receptor. En *Vitamins and Hormones* (1a ed., Vol. 80). [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00603-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00603-1)
- Jiu, Y. M., Yue, Y., Yang, S., Liu, L., Yu, J. W., Wu, Z. X., & Xu, T. (2010). Insulin-like signaling pathway functions in integrative response to an olfactory and a gustatory stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Protein and Cell*, 1(1), 75–81. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0003-4>
- Jurdak, N., & Kanarek, R. B. (2009). Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiology and Behavior*, 96(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.023>
- Kang, S., Kim, C. H., Jung, H., Kim, E., Song, H. T., & Lee, J. E. (2017). Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. *Neuropharmacology*, 113, 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.029>
- Kang, S., Lee, Y., & Lee, J. E. (2017). *Metabolism-Centric Overview of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*. 58(3), 479–488.
- Kovács, T., Cairns, N. J., & Lantos, P. L. (1999). β -amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in the olfactory bulb in ageing and Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 25(6), 481–491. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.1999.00208.x>
- Kovács, Tibor, Cairns, N. J., & Lantos, P. L. (2001). Olfactory centres in alzheimer's

- disease: olfactory bulb is involved in early braak's stages. *NeuroReport*, 12(2), 285–288. <https://doi.org/10.1097/00001756-200102120-00021>
- Kreisl, W. C., Jin, P., Lee, S., Dayan, E. R., Vallabhajosula, S., Pelton, G., ... Devanand, D. P. (2018). Odor identification ability predicts PET amyloid status and memory decline in older adults. *J Alzheimers Dis*, 62(4), 9–19. <https://doi.org/10.3233/JAD-170960>
- Kubis-Kubiak, A. M., Rorbach-Dolata, A., & Piwowar, A. (2019). Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: Friends or foes? *Mechanisms of Ageing and Development*, 181(May), 7–21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.03.008>
- Kullmann, S., Heni, M., Hallschmid, M., Fritsche, A., Preissl, H., & Häring, H. U. (2016). Brain insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans. *Physiological Reviews*, 96(4), 1169–1209. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2015>
- Laird, F. M., Cai, H., Savonenko, A. V., Farah, M. H., He, K., Melnikova, T., ... Wong, P. C. (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *Journal of Neuroscience*, 25(50), 11693–11709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2766-05.2005>
- Lalanza, J. F., & Snoeren, E. M. S. (2021). The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 122(January), 92–119. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.003>
- Lang, P., Hasselwander, S., Li, H., & Xia, N. (2019). Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55987-x>
- Lee, S.-H., Zabolotny, J. M., Huang, H., Lee, H., & Kim, Y.-B. (2016). Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. *Molecular Metabolism*, 5(8), 589–601. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.06.011>
- Lemos, C., Rial, D., Gonçalves, F. Q., Pires, J., Silva, H. B., Matheus, F. C., ... 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.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.018>

- Lietzau, G., Davidsson, W., Östenson, C. G., Chiazza, F., Nathanson, D., Pintana, H., ... Patrone, C. (2018). Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity; effects partly reversed by the DPP-4 inhibitor Linagliptin. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0517-1>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 183, 265–275.
- Luque-Contreras, D., Carvajal, K., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., & Campos-Peña, V. (2014). Oxidative stress and metabolic syndrome: Cause or consequence of Alzheimer's disease? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/497802>
- Mahmoudi, M., Charradi, K., Limam, F., & Aouani, E. (2018). Grape seed and skin extract as an adjunct to xenical therapy reduces obesity, brain lipotoxicity and oxidative stress in high fat diet fed rats. *Obesity Research and Clinical Practice*, 12(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2016.04.006>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169, 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Marr, R. A. (2016). The Amyloid β Precursor Protein and Cognitive Function in Alzheimer's Disease. En *Genes, Environment and Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802851-3.00004-8>
- Maslov, L. N., Naryzhnaya, N. V., Boshchenko, A. A., Popov, S. V., Ivanov, V. V., & Oeltgen, P. R. (2019). Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? *Journal of Clinical and Translational Endocrinology*, 15(May 2018), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2018.11.001>
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- McKhann, G. (2012). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease:

- Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease Guy. *Alzheimers Dement*, 7(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.The
- Mena López, R., Luna Muñoz, J., García Sierra, F., & Hernández Alejandro, M. (2003). Histopatología Molecular De La Enfermedad De Alzheimer. *Revista Digital Universitaria*, 4–7. Recuperado de http://www.revista.unam.mx/vol.4/num7/art20/nov_art20.pdf
- Mlinar, B., Marc, J., Janež, A., & Pfeifer, M. (2007). Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta*, 375(1–2), 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.07.005>
- Mohamed, W. A., Salama, R. M., & Schaalán, M. F. (2019). A pilot study on the effect of lactoferrin on Alzheimer's disease pathological sequelae: Impact of the p-Akt/PTEN pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 111(December 2018), 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.118>
- National Institute of Health (NIH). (2017). What Is Dementia? Symptoms, Types, and Diagnosis. Recuperado el 28 de octubre de 2019, de US DH&HS website: <https://www.nia.nih.gov/health/what-dementia-symptoms-types-and-diagnosis>
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci*, 34, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>.Amyloid
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). Demencia. Recuperado el 9 de enero de 2020, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Pandini, G., Pace, V., Copani, A., Squatrito, S., Milardi, D., & Vigneri, R. (2013). Insulin has multiple anti-amyloidogenic effects on human neuronal cells. *Endocrinology*, 154(1), 375–387. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1661>
- Penke, B., Bogár, F., & Lívía, F. (2017). β -amyloid and the pathomechanisms of Alzheimer's disease: A comprehensive view. *Molecules*, 22(10), 1–31. <https://doi.org/10.3390/molecules22101692>
- Pérez-Herrera, A., & Cruz-López, M. (2019). Situación actual de la obesidad infantil en México. *Nutrición hospitalaria*, 36(2)(April), 463–469. <https://doi.org/0.20960/nh.2116>

- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Pivovarova, O., Höhn, A., Grune, T., Pfeiffer, A. F. H., & Rudovich, N. (2016). Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? *Annals of Medicine*, 48(8), 614–624. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1197416>
- Plum, L., Schubert, M., & Bru, J. C. (2005). *The role of insulin receptor signaling in the brain*. 16(2). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.008>
- Praticò, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2001). Increased Lipid Peroxidation Precedes Amyloid Plaque Formation in an Animal Model of Alzheimer Amyloidosis. *The Journal of Neuroscience*, 21(12), 4183–4187.
<https://doi.org/21/12/4183> [pii]
- Prediger, R. D., Schamne, M. G., Sampaio, T. B., Moreira, E. L. G., & Rial, D. (2019). Animal models of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. En *Handbook of Clinical Neurology* (1a ed., Vol. 164). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00024-1>
- Raj, A., Dey, S., Maheshwari, D. U., Manjula, S. N., Madhunapantula, S. V., & Ali, M. (2019). Evaluating the olfactory dysfunction and cognitive deficits induced by intracerebroventricular injection of Amyloid beta (1-42) in female C57BL/6 mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(10), 24–34.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.91004>
- Reaven, E. P., & Reaven, G. M. (1974). Mechanisms for development of diabetic hypertriglyceridemia in streptozotocin treated rats. Effect of diet and duration of insulin deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 54(5), 1167–1178.
<https://doi.org/10.1172/JCI107860>
- Rebolledo-Solleiro, D., Solleiro-Villavicencio, H., Velasco, M., & Roldán-Roldán, G. (2020). Obesidad, síndrome metabólico y percepción olfativa. *Revista de neurologia*, 70(2), 53–66. <https://doi.org/10.33588/rn.7002.2019204>
- Reitz, C. (2013). Dyslipidemia and the risk of alzheimer's disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 15(3), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11883-012-0307-3>
- Rivera-Silva, G., Rodríguez-Reyes, L., & Treviño-Alanís, M. G. (2018). El envejecimiento

- de la población mexicana The aging of Mexican population. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 56(1), 2. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2018/im181r.pdf>
- Rivière, S., Soubeyre, V., Jarriault, D., Molinas, A., Léger-Charnay, E., Desmoulins, L., ... Grosmaître, X. (2016). High Fructose Diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34011>
- Rochlani, Y., Venkata Pothineni, N., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease Review*, 11(8), 215–225. <https://doi.org/10.1177/17539447>
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutrition and Diabetes*, 10(24), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>
- Sajjad, R., Arif, R., Shah, A. A., Manzoor, I., & Mustafa, G. (2018). Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Role of Amyloid-beta and Hyperphosphorylated Tau Protein. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(4), 581–591. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000397>
- Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Pérez-Cruz, C., Pichardo-Ontiveros, E., Wang, M., Donovan, S. M., ... Torres, N. (2017). Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Scientific Reports*, 7(1), 4716. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05096-4>
- Sanes, J. R., & Jessell, T. (2013). The aging brain. En E. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, & A. Hudspeth (Eds.), *Principles of Neural Science* (Fifth Edit, pp. 1328–1346). New York: McGraw-Hill.
- Schmued, L. C., Stowers, C. C., Scallet, A. C., & Xu, L. (2005). Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Research*, 1035(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.054>
- Speakman, J. R. (2019). Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *International Journal of Obesity*, 43(8), 1491–1492.

- <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>
- Sperling, R., Dickerson, B., Pihlajamaki, M., Vannini, P., LaViolette, P., Vitolo, O., ... Johnson, K. A. (2010). Functional Alterations in Memory Networks in Early Alzheimer's Disease. *Neuromolecular Med*, 12(1), 27–43.
<https://doi.org/10.1007/s12017-009-8109-7>
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, 52(4), 313–320.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>
- Van Der Kant, R., & Goldstein, L. S. B. (2015). Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Developmental Cell*, 32(4), 502–515. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>
- Vandal, M., White, P. J., Tremblay, C., St-Amour, I., Chevrier, G., Emond, V., ... Calon, F. (2014). Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A β and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes*, 63(12), 4291–4301.
<https://doi.org/10.2337/db14-0375>
- Vandenbergh, R., & Tournoy, J. (2005). Cognitive aging and Alzheimer's disease. *Postgraduate Medical Journal*, 81(956), 343–352.
<https://doi.org/10.1136/pgmj.2004.028290>
- Warburton, E. C. (2018). Using the Spontaneous Object Recognition Memory Tasks to Uncover the Neural Circuitry of Recognition Memory: The Importance of Thalamic Nuclei. En *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 27).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00013-6>
- Watanabe, M., Hayasaki, H., Tamayama, T., & Shimada, M. (1998). Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(2), 243–256. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000200008>
- Wesson, D. W., Morales-Corraliza, J., Mazzella, M. J., Wilson, D. A., & Mathews, P. M. (2013). Chronic anti-murine A β immunization preserves odor guided behaviors in an Alzheimer's β -amyloidosis model. *Behavioural Brain Research*, 237(1), 96–102.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.019>
- Xiang, Q., Zhang, J., Li, C. Y., Wang, Y., Zeng, M. J., Cai, Z. X., ... Li, X. H. (2015).

- Insulin resistance-induced hyperglycemia decreased the activation of Akt/CREB in hippocampus neurons: Molecular evidence for mechanism of diabetes-induced cognitive dysfunction. *Neuropeptides*, *54*, 9–15.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.08.009>
- Yaffe, K., Freimer, D., Chen, H., Asao, K., Rosso, A., Rubin, S., ... Simonsick, E. (2017). Olfaction and risk of dementia in a biracial cohort of older adults. *Neurology*, *88*(5), 456–462. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003558>
- Yang, M., & Crawley, J. N. (2001). Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current Protocols in Neuroscience*, 1–14. <https://doi.org/10.1002/0471142301>
- Yeh, S. H. H., Shie, F. S., Liu, H. K., Yao, H. H., Kao, P. C., Lee, Y. H., ... Tsay, H. J. (2020). A high-sucrose diet aggravates Alzheimer’s disease pathology, attenuates hypothalamic leptin signaling, and impairs food-anticipatory activity in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiology of Aging*, *90*, 60–74.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.11.018>
- Zafar, U., Khaliq, S., Ahmad, H. U., Manzoor, S., & Lone, K. P. (2018). Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. *Hormones*, *17*(3), 299–313. <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0051-3>
- Zanto, T. P., Hennigan, K., Östberg, M., Clapp, W. C., & Gazzaley, A. (2010). Should olfactory dysfunction be used as a biomarker of Alzheimer’s disease? *Expert Rev Neurother*, *10*(5), 564–574. <https://doi.org/10.1586/ern.10.33>
- Zhao, B., Wang, Y., Liu, R., Jia, X.-L., Hu, N., An, X.-W., ... Li, X.-H. (2020). Rutaecarpine Ameliorated High Sucrose-Induced Alzheimer’s Disease Like Pathological and Cognitive Impairments in Mice. *Rejuvenation Research*, 1–30.
<https://doi.org/10.1089/rej.2020.2349>
- Zhao, W. Q., & Townsend, M. (2009). Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer’s disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1792*(5), 482–496.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.014>
- Zhuang, Z. Q., Shen, L. L., Li, W. W., Fu, X., Zeng, F., Gui, L., ... Wang, Y. J. (2018). Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, *63*(4). <https://doi.org/10.3233/JAD-180176>

Zvěřová, M. (2019). Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*, 72(April), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.04.015>

11. Anexos

Anexo 1. Criterios clínicos centrales del Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer para el diagnóstico de demencia.

Demencia: aquellos síntomas cognitivos o conductuales (neuropsiquiátricos) que están presentes cuando:

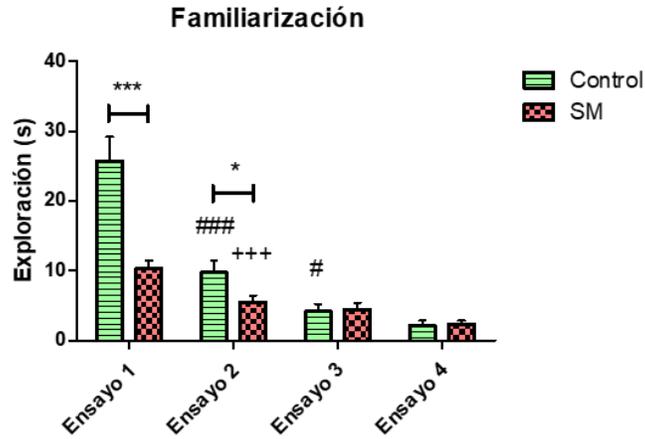
1. Interfieren con la capacidad de funcionar en el trabajo o en las actividades habituales.
2. Representan una disminución de los niveles anteriores de funcionamiento y rendimiento. 3. No se explican por delirio o trastorno psiquiátrico mayor.
4. El deterioro cognitivo se detecta y diagnostica mediante una combinación de:
 - a. Historia clínica del paciente y un cuidador bien informado
 - b. Una evaluación cognitiva objetiva, ya sea un examen del estado mental junto a la cama o una prueba neuropsicológica (las pruebas neuropsicológicas deben realizarse cuando el historial de rutina y el examen del estado mental junto a la cama no pueden proporcionar un diagnóstico confiable)
5. El deterioro cognitivo o conductual implica un mínimo de 2 de los siguientes dominios:
 - a. Discapacidad para adquirir y recordar nueva información. Los síntomas incluyen preguntas o conversaciones repetitivas, extraviar pertenencias personales, olvidar eventos o citas, perderse en una ruta familiar.
 - b. Razonamiento y manejo de tareas complejas, falta de criterio. Los síntomas incluyen poca comprensión de los riesgos de seguridad, incapacidad para administrar las finanzas, poca capacidad de toma de decisiones, incapacidad para planificar actividades complejas o secuenciales.
 - c. Habilidades visoespaciales deterioradas. Los síntomas incluyen incapacidad para reconocer caras u objetos comunes o para encontrar objetos a la vista directa a pesar de la buena agudeza, incapacidad para operar implementos simples u orientar la ropa hacia el cuerpo.
 - d. Funciones del lenguaje deterioradas (hablar, leer, escribir). Los síntomas incluyen dificultad para pensar en palabras comunes al hablar, dudas; errores de habla, ortografía y escritura.
 - e. Cambios en la personalidad o el comportamiento. Los síntomas incluyen fluctuaciones de humor no características, como agitación, motivación alterada, iniciativa, apatía, pérdida de impulso, retraimiento social, disminución del interés en actividades anteriores, pérdida de empatía, comportamientos compulsivos u obsesivos, comportamientos socialmente inaceptables.

Tomado de McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7(3):265.

Anexo 2. Tabla comparativa de diferentes modelos de SM, su efecto sobre la memoria, expresión de proteínas involucradas en la patogénesis de la EA y tratamientos sensibilizadores de la insulina.

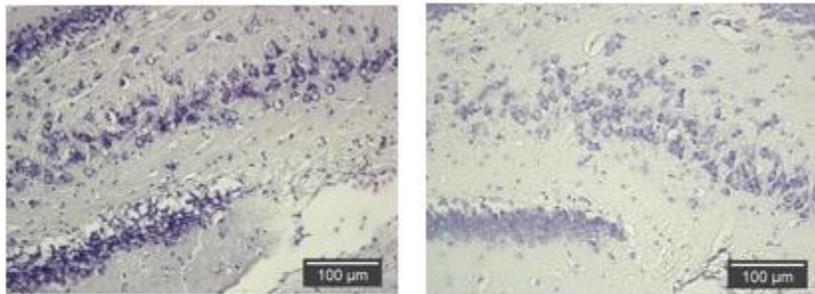
Cepa	Dieta o tratamiento	Tiempo	Memoria	Biomarcador	Tratamiento	Efecto	Referencia
Ratón 3xTg-AD	DAG	9 meses	↓NOR ↑Lat. Barnes M	↑βA ↑BACE-1	Insulina <i>ip</i>	↑NOR ↓βA ↓BACE-1	(Vandal et al., 2014)
Ratón ICR	DAG + STZ <i>ip</i>	16 semanas	↓Morris	↑βA ↑p-tau ↑GSK-3β	Agmatina <i>ip</i>	↑Morris↓βA ↓p-tau ↓GSK-3β	(Kang, Kim, et al., 2017)
Ratón C57BL/6J	DAG	16 semanas	↓Morris ↓T Maze	-	Insulina <i>ihc</i>	↑Morris ↑T Maze	(Gladding, Abbott, Antoniadis, Stuart, & Begg, 2018)
Rata Sprague Dawley	DAC 10%	3 semanas	~NOR ↓NOL	-	-	-	(Beilharz et al., 2014)
Rata Wistar	DAC 35%	10 semanas	↓NOR ↓NOL	↓fEPSP TAp	-	-	(Lemos et al., 2016)
Rata Sprague Dawley	DAC 10%	8 semanas	↓NOR	-	-	-	(Buyukata et al., 2018)

DAC: dieta alta en carbohidratos; DAG: dieta alta en grasas; NOR: reconocimiento de objeto novedoso; NOL: reconocimiento de localización novedosa; Lat: Latencia; *ip*: intraperitoneal; *ihc*: intrahipocampal; fEPSP: Potenciales de campo postsinápticos excitatorios; TAp: vía temporoamónica.

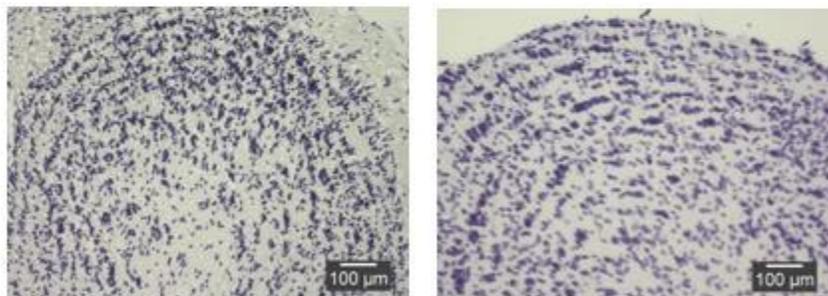


Anexo 3. Tiempos de exploración en la fase de familiarización de la prueba NOR. *** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.05$ Control vs. SM; ### $p \leq 0.001$ Ensayo 2 vs. Ensayo 1, # $p \leq 0.05$ Ensayo 3 vs Ensayo 2 Control; +++ $p \leq 0.001$ Ensayo 2 vs. Ensayo 1 SM. Control $n = 7$, SM $n = 17$. Media \pm EEM.

Hipocampo (GD-CA3)



Bulbo olfatorio anterior



Control

SM

Anexo 4. Imágenes representativas de la citoarquitectura de las neuronas del hipocampo y bulbo olfatorio de ambos grupos.