



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA SILIMARINA SOBRE EL ESTADO COGNITIVO ASOCIADO A LA OBESIDAD
INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. TORRES CASTRO PAOLA XIMENA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA SILIMARINA SOBRE EL ESTADO COGNITIVO ASOCIADO A LA OBESIDAD
INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. TORRES CASTRO PAOLA XIMENA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1198/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de septiembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **TORRES CASTRO PAOLA XIMENA** con número de cuenta **307309482** con la tesis titulada **“EFECTO DE LA SILIMARINA SOBRE EL ESTADO COGNITIVO ASOCIADO A LA OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN
Vocal: DRA. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR
Vocal: DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN
Secretario(a): DRA. TATIANA FIOREDELISIO COLL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de diciembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme acceder a la mejor formación académica y continuar con mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de la beca de posgrado para poder estudiar la Maestría en Ciencias Biológicas (CVU 814501).

A la Dra. Anahí Chavarría Krauser directora de esta tesis por dirigir esta investigación y compartir su conocimiento con amabilidad.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Tatiana Fiordeliso Coll y al Dr. Abel Santamaría del Ángel por sus observaciones y aportaciones a la investigación.

Agradecimientos personales

Expreso mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México por recibirme e instruirme a nivel educativo, personal y espiritual. Al CCH-Vallejo, a la Facultad de Ciencias y al Posgrado en Ciencias Biológicas. *“Por mi raza hablará el espíritu”*

A mi asesora de tesis la Dra. Anahí Chavarría Krauser, por aceptarme como su estudiante. Por el acompañamiento en este camino, siempre con palabras amables con comprensión y sabiduría. Muchísimas gracias Anahí.

A mi asesora de tesis de licenciatura la Dra. Citlali Trueta, porque su voz se convirtió en mi voz interior para hacer ciencia lo mejor posible.

A la Dra. Mara Alaide Guzman Ruíz por su retroalimentación a la investigación y su colaboración en los experimentos.

A los miembros de mi comité tutorial. Al Dr. Abel Santamaría y a la Dra. Tatiana Fiordelisis, les admiro y aprecio profundamente.

A mis sinodales, por el tiempo dedicado a la revisión de este escrito y por sus observaciones que mejoraron este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Neuroinmunología de la Unidad de Medicina Experimental por compartir su conocimiento y colaborar en los experimentos realizados en este proyecto. Mi sincero agradecimiento a Arturo Luna, Erick León, Jesús Pérez y Julia Rodríguez.

Gracias a Nachita por recibirme en la UME con una gran sonrisa, a Espiridión Ramos y a Ricardo Vargas por compartir sus experiencias de vida conmigo y hacer más agradable mi estancia en el laboratorio.

Si estoy aquí es porque he estado parada sobre hombros de gigante. Esos gigantes para mí son mis padres J Santos Torres y Ana María Castro. Los amo, gracias por todo el esfuerzo que han hecho en su vida para que yo esté bien.

A Greg, por tu muy peculiar forma de demostrar el cariño y a ayudarme a ser feliz. Te amo hermano.

A mis abuelos maternos, Jorge Castro y Josefina Martínez. Su mirada de amor y orgullo me impulsa a ser mejor persona cada día, su confianza en mí es un tesoro invaluable que me acompaña siempre.

A mi novio Julio Rey, te quiero mucho mi amor. Gracias por acompañarme mientras escribía la tesis, por creer y confiar en mí, y por compartir tu alegría conmigo.

A la familia Silva Castro. Gracias Monse y Kole por ser un gran apoyo en mi vida. A la familia Torres Garduño. Te quiero mucho Chuys. Con cariño a mi primo Monchis y a mi tía Carmela.

A mis muy queridas amigas desde el CCH-Vallejo: Lizbeth Cruz, Citlalli Silva y Jessica Sánchez. Muchas gracias amigas!!

A mis amigos que desde la facultad llenan de alegría mis días y que disfruté enormemente las conversaciones con ustedes. Gracias a Victoria Levario, Karen Peña, Nayelli Jiménez, Marco Molina, Ángel Mares y Jazhiel.

A mi querido amigo Adrián.

Índice

Abreviaturas

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	5
La obesidad es un problema de salud nacional y mundial	5
La acumulación del tejido adiposo produce alteraciones metabólicas	6
Patofisiología del tejido adiposo en la obesidad.....	7
Generalidades del estrés oxidante en una condición patofisiológica	10
Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	11
El cerebro durante la obesidad: mecanismos que promueven neuroinflamación y estrés oxidante ..	16
Funciones cognitivas: Aprendizaje y memoria.....	20
Uso de antioxidantes para disminuir las alteraciones cognitivas observadas durante la obesidad	23
<i>Silybum marianum</i>	27
3. Planteamiento del problema.....	30
4. Hipótesis	30
5. Objetivos.....	31
General	31
Específicos	31
6. Metodología	32
Animales	32
Inducción de la obesidad.....	32
Tratamiento de silimarina	32
Diseño experimental	33
Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal	34
Procedimiento conductual	34
Obtención y análisis de muestras	37
Determinación de marcadores de estrés oxidante.....	37

Análisis estadístico	40
7. Resultados	41
Alteraciones metabólicas asociadas a la acumulación de tejido adiposo	41
Efecto de la dieta alta en grasa sobre el peso corporal	41
El tratamiento de silimarina no causó una disminución en el peso corporal	42
Efecto de la dieta alta en grasa sobre el metabolismo de glucosa	44
La silimarina disminuye los niveles de glucosa en el grupo de animales alimentados con dieta alta en grasa.....	47
El tratamiento de la silimarina no disminuyó el porcentaje del tejido adiposo blanco retroperitoneal en los animales alimentados con dieta alta en grasa.....	50
Efecto de la silimarina en las pruebas conductuales: reconocimiento de objeto novedoso, reconocimiento de objeto novedoso en contexto y laberinto acuático de Morris.....	51
Reconocimiento de objeto novedoso	51
Reconocimiento de objeto novedoso en contexto	52
Laberinto acuático de Morris	54
Efecto de la dieta y del tratamiento de silimarina sobre el estrés oxidante en la corteza prefrontal y el hipocampo.....	56
Efecto de la silimarina sobre la concentración de malondialdehído (MDA) en la corteza prefrontal y en el hipocampo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.....	56
Efecto de la silimarina sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa y catalasa en el SNC de animales alimentados con una dieta alta en grasa	57
Actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa.....	59
8. Discusión general.....	61
9. Conclusiones	69
10. Perspectivas.....	69
11. Referencias bibliográficas.....	70

Abreviaturas

4-HNE 4-hidroxi-2-nonenal

AdipoR1 Receptor uno de adiponectina

AdipoR2 Receptor dos de adiponectina

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADP Adenosín difosfato

AMPK Proteína cinasa activada por monofosfato de adenina

BDNF Factor neurotrófico derivado de cerebro

BHE Barrera hematoencefálica

CAT Catalasa

COX-2 Ciclooxygenasa 2

CuZnSOD Enzima CuZn superóxido dismutasa

ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

EO Estrés oxidante

ERO1 Proteína oxidoreductina del retículo endoplásmico 1

ERON Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

FFA Ácidos grasos libres

GFAP Proteína glial fibrilar acídica

GR Glutati3n reductasa

GSG Glutati3n

GSH Glutati3n

GSH-Px Glutati3n peroxidasa

GSSG Glutati3n oxidado

H₂O₂ Per3xido de hidr3geno

HFD Dieta alta en grasa

HO₂[•] Radical perhidroxilo

Iba-1 Proteína de uni3n a calcio

IL-1 Interleucina 1

IL-6 Interleucina 6

IMC Índice de masa corporal

iNOS Sintasa de óxido nítrico inducible

IRS-1 Substrato uno del receptor de insulina

IκB Inhibidor del factor nuclear kappa

L• Radical libre lipídico

LAM Laberinto acuático de Morris

LPS Lipopolisacáridos

MDA Malondialdehído

MnSOD Enzima manganeso superóxido dismutasa

MyD88 Proteína adaptadora de diferenciación mieloide 88

NADH Nicotinamida adeninucleótido reducido

NBT Azul de nitro-tetrazolio

NF-κB Factor de transcripción nuclear Kappa B

NLRP3 Familia NLR que contiene el dominio pirina 3

NOS Óxido nítrico sintasa

O₂ Oxígeno molecular

O₂•- Radical anión superóxido

OCDE Organización para la Cooperación del Desarrollo Económico

OH• Radical hidroxilo

OMS Organización Mundial de la Salud

ON• Óxido nítrico

ONOO⁻ Peroxinitrito

PPAR Receptor activado por proliferadores de los peroxisomas

PPAR- α Receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alfa

PRON Prueba de reconocimiento de un objeto novedoso

PROC Prueba de reconocimiento de un objeto en contexto

PUFA Ácidos grasos poliinsaturados

RL Radical libre

RO• Radical alcoxilo

ROO* Radical peroxilo

ROOH Hidroperóxido

ROS Especies reactivas de oxígeno

SeGSHpx Enzima glutatión peroxidasa dependiente de selenio

SNC Sistema nervioso central

SOD Superóxido dismutasa

TAK1 Cinasa 1 del factor de crecimiento transformador beta

TGs Triglicéridos

TLR4 Receptor tipo Toll 4

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

TRAF6 Factor 6 asociado al factor de necrosis tumoral

Índice de figuras

Figura 1 Representación del laberinto acuático de Morris.	22
Figura 2 Reacción de la enzima superóxido dismutasa.	24
Figura 3 Reacción de la enzima catalasa.....	24
Figura 4 Actividad de la enzima glutatión peroxidasa.	25
Figura 5 Estructura de la molécula antioxidante endógena no enzimática Glutatión reducido (GSH)....	26
Figura 6 Composición del extracto estandarizado de la silimarina.	27
Figura 7 Diseño experimental.	33
Figura 8 Esquema del procedimiento de la prueba conductual Reconocimiento de objeto novedoso en contexto.	36
Figura 9 Ganancia de peso corporal..	42
Figura 10 Efecto de la dieta alta en grasa sobre el metabolismo de captura de glucosa.	
Figura 11 Efecto de la silimarina sobre el metabolismo de captura de glucosa en animales alimentados con una dieta alta en grasa.	48
Figura 12 Tejido adiposo blanco retroperitoneal.	50
Figura 13 Gráficos de los índices de reconocimiento de objeto novedoso.....	52
Figura 14 Gráficos de los índices de reconocimiento de objeto novedoso en contexto.	53
Figura 15 Efecto de la dieta alta en grasa y de la silimarina sobre la prueba de laberinto acuático de Morris.....	54
Figura 16 Efecto de la silimarina sobre la concentración de malondialdehído (MDA) en la corteza prefrontal y el hipocampo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa..	57
Figura 17 Efecto de la silimarina sobre la actividad de las enzimas la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en la corteza prefrontal y en el hipocampo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.....	58
Figura 18 Actividad del sistema antioxidante de glutatión: glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST) en la corteza prefrontal y el hipocampo.	60

Índice de tablas

Tabla 1 Características de la dieta	32
Tabla 2 Mezcla de la reacción para determinar la actividad de SOD en el tejido cerebral.....	39
Tabla 3 Mezcla de reacción para determinar la actividad de GPx en el tejido cerebral	40
Tabla 4 La administración de silimarina no modifica el peso corporal.	43
Tabla 5 Valores de las concentraciones de glucosa en sangre (mg/dl) previo al tratamiento con silimarina.	46
Tabla 6 Valores de las concentraciones de glucosa en sangre (mg/dl) después del tratamiento con silimarina.....	49
Tabla 7 Índices de reconocimiento del objeto novedoso para evaluar memoria de corto y largo plazo.	52
Tabla 8 Índices de reconocimiento del objeto novedoso en contexto para evaluar memoria de corto y largo plazo.....	53
Tabla 9 Valores del tiempo en segundo de latencia de escape en la curva de aprendizaje de la prueba de laberinto acuático de Morris.	55
Tabla 10 Valores del tiempo en segundos del tiempo de nado el día de la prueba en el cuadrante donde estaba la plataforma del laberinto acuático de Morris.	55

Resumen

El sobrepeso y la obesidad son enfermedades de interés mundial que están asociadas al desarrollo de otras enfermedades como las cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, y al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Muchas de las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un deterioro cognitivo, por lo que es necesario entender esta condición y buscar estrategias terapéuticas. La obesidad es una acumulación excesiva del tejido adiposo en la que se desarrolla una condición de inflamación crónica de bajo grado acompañada de estrés oxidante. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto antioxidante y antiinflamatorio del extracto estandarizado silimarina, que proviene de la planta *Silybum marianum*, en un modelo murino de obesidad inducido por una dieta alta en grasa (HFD) durante 14 semanas. Para este objetivo, se utilizaron ratas macho Wistar, se formaron cuatro grupos experimentales: dos alimentados con una dieta estándar (control) y dos grupos alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, 54% de lípidos). Los cuatro grupos fueron los siguientes: control vehículo, control silimarina, HFD vehículo y HFD silimarina. La dosis de silimarina fue de 200 mg/kg/día disuelto en aceite vegetal, administrado vía oral (0.5 mL) durante 14 días. A la semana 12, los animales que recibieron la HFD tuvieron un peso corporal 30% mayor que los animales que recibieron la dieta estándar. Dado que la HFD altera negativamente el metabolismo de glucosa, se evaluó el efecto de silimarina sobre este parámetro, a través de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal antes y después del tratamiento. La silimarina mejoró el metabolismo al reducir los niveles de glucosa en sangre de los animales HFD comparado con los animales HFD que recibieron solo el vehículo.

En diversos trabajos de investigación en modelos murinos, se ha evidenciado que la HFD impacta negativamente en el desempeño cognitivo (aprendizaje y memoria). En este trabajo se evaluó el efecto de la HFD en un protocolo de 14 semanas de inducción y el efecto de la silimarina sobre el aprendizaje y la memoria, a través de tres pruebas conductuales: 1) la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, 2) la prueba de reconocimiento de objeto novedoso en contexto y 3) el laberinto acuático de Morris. En la prueba de reconocimiento de objeto novedoso a corto plazo, el grupo HFD vehículo presentó un índice de reconocimiento menor a 0.5, sugiriendo que no recordaba el objeto previamente presentado; mientras, en el mismo experimento, el grupo HFD con silimarina presentó un índice mayor a 0.5, sugiriendo que recordaba el objeto anteriormente presentado. En pruebas de memoria de

reconocimiento de objeto novedoso en contexto y laberinto acuático de Morris no mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales, es decir, la HFD durante 14 semanas no afectó el aprendizaje ni la memoria, del mismo modo la silimarina no modificó la conducta.

Investigaciones previas han reportado que la obesidad desarrolla una condición de estrés oxidante en el sistema nervioso central. En este proyecto, nos preguntamos si las ratas HFD después del tratamiento con silimarina tendrían un impacto sobre la condición de estrés oxidante en el cerebro. Para ello, se evaluaron diversos marcadores de estrés oxidante, como: a) la peroxidación lipídica de manera indirecta a través de la cuantificación del metabolito secundario MDA, b) la actividad de diversas enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, y c) el sistema de glutatión que consta de las tres enzimas: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa. De todos los marcadores, solo se encontró diferencia significativa en el incremento de la actividad de la catalasa en la corteza prefrontal del grupo HFD silimarina comparado con los tres grupos restantes y de la glutatión S-transferasa en el hipocampo de los grupos HFD vehículo y HFD silimarina comparado con el grupo control. Nuestros resultados sugieren que, si bien la HFD alteró el metabolismo de glucosa, la silimarina tuvo un efecto protector.

En el caso de las pruebas conductuales que evalúan aprendizaje y memoria, así como en el resto de los parámetros evaluados de daño oxidante, no se encontraron cambios con el tratamiento con silimarina. Podría ser que el tiempo de tratamiento con la HFD no fuera suficiente, por lo que no se puede descartar el efecto neuroprotector de la silimarina.

En conclusión, nuestro modelo murino de obesidad inducido por la HFD incrementó el peso corporal de los animales, alteró el metabolismo de glucosa y la silimarina lo mejoró. Así mismo, la HFD afectó la memoria de corto plazo evaluado en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso y la silimarina mejoró el desempeño en esta misma prueba. Por último, después de 14 semanas de HFD, no se observaron alteraciones en los parámetros de estrés oxidante que se evaluaron.

Abstract

Overweight and obesity are diseases of global concern that are associated with the development of comorbidities such as cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and the development of neurodegenerative diseases. Many of the neurodegenerative diseases are characterized by cognitive impairment, so understanding this condition and seeking therapeutic strategies are necessary. Obesity is an excessive accumulation of adipose tissue in which a condition of chronic low-grade inflammation accompanied by oxidative stress develops. The aim of this project was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effect of the standardized extract silymarin, which comes from the plant *Silybum marianum*, in a murine model of obesity induced by a high fat diet (HFD) for 14 weeks. For this objective, male Wistar rats were used, four experimental groups were formed: two fed with a standard diet (control) and two groups fed with a high fat diet (HFD, 54% lipids). The four groups were as follows: vehicle control, silymarin control, vehicle HFD and silymarin HFD. The dose of silymarin was 200 mg/kg/day dissolved in vegetable oil, administered orally (0.5 mL) for 14 days. At week 12, the animals receiving the HFD had a 30% higher body weight than the animals receiving the standard diet. Since HFD negatively alters glucose metabolism, the effect of silymarin on this parameter was evaluated by intraperitoneal glucose tolerance test before and after treatment. Silymarin improved metabolism by reducing blood glucose levels in HFD animals compared to HFD animals receiving vehicle alone.

Several research studies in murine models have shown that HFD negatively impacts cognitive performance (learning and memory). In this work, we evaluated the effect of HFD in a 14-week induction protocol and the effect of silymarin on learning and memory, through three behavioral tests: 1) the novel object recognition test, 2) the novel object recognition test in context and 3) the Morris water maze. In the short-term novel object recognition test, the vehicle HFD group presented a recognition index lower than 0.5, suggesting that they did not remember the previously presented object; while, in the same experiment, the silymarin HFD group presented an index higher than 0.5, suggesting that they remembered the previously presented object. In tests of novel object recognition memory in context and Morris water maze showed no significant differences between the four experimental groups, i.e., HFD for 14 weeks did not affect learning or memory, likewise silymarin did not modify behavior.

Previous research has reported that obesity develops an oxidative stress condition in the central nervous system. In this project, we asked whether HFD rats after silymarin treatment would have an impact on the oxidative stress condition in the brain. For this purpose, several markers of oxidative stress were evaluated, such as: a) lipid peroxidation indirectly through quantification of the secondary metabolite MDA, b) the activity of various antioxidant enzymes such as catalase and superoxide dismutase, and c) the glutathione system consisting of the three enzymes: glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase. Of all the markers, significant differences were found only in the increase of catalase activity in the prefrontal cortex of the HFD silymarin group compared to the other three groups and of glutathione S-transferase in the hippocampus of the HFD vehicle and HFD silymarin groups compared to the control group.

Our results suggest that while HFD altered glucose metabolism, silymarin had a protective effect. In the case of the behavioral tests that evaluate learning and memory, as well as in the rest of the evaluated parameters of oxidative damage, no changes were found with silymarin treatment. It could be that the treatment time with HFD was not sufficient, so the neuroprotective effect of silymarin cannot be ruled out.

In conclusion, our murine model of obesity induced by HFD increased the body weight of the animals, altered glucose metabolism and silymarin improved it. Likewise, HFD affected short-term memory evaluated in the novel object recognition test and silymarin improved performance in this same test, finally, after 14 weeks of HFD no alterations were observed in the oxidative stress parameters that were evaluated.

1. Introducción

La obesidad se caracteriza por la acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo en el cuerpo, y se asocia con un estado de estrés oxidante y de inflamación crónica sistémica también llamada metainflamación, la cual incluye a la inflamación del sistema nervioso central (neuroinflamación). Investigaciones recientes han identificado que el sobrepeso y la obesidad tienen un efecto negativo en el balance de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON), así como en el metabolismo de glucosa. También se ha visto un decremento en la cognición, en particular sobre la memoria, el aprendizaje, la atención y la velocidad de respuesta. Estas funciones están asociadas a estructuras cerebrales como el hipocampo y la corteza cerebral prefrontal (Vuong *et al.*, 2017). En este proyecto evaluamos si el tratamiento con silimarina, un extracto estandarizado de flavolignanós de la planta *Silybum marianum*, tiene un efecto positivo en el metabolismo de la glucosa, en el desempeño cognitivo y en el control del estrés oxidante en el sistema nervioso central (SNC), en un modelo murino de obesidad inducido por una dieta alta en grasa (HFD).

2. Antecedentes

La obesidad es un problema de salud nacional y mundial

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva del tejido adiposo. Para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos se utiliza el índice de masa corporal (IMC), el cual se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). La OMS asigna sobrepeso cuando el IMC es igual o superior a 25 y obesidad igual o superior a 30. En 2016, la OMS reportó que el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% obesidad. En 2018, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reportó que el 76.8% de mujeres y 73% de hombres adultos mexicanos tenían sobrepeso y obesidad.

México es el segundo país con mayor obesidad de adultos en el mundo. De acuerdo con la Organización para la Cooperación Del Desarrollo Económico (OCDE) el impacto socioeconómico de la obesidad en México es alto, y tiene un costo anual de 200 millones de dólares en tratamiento médico. Además, la obesidad incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, principalmente las cardiopatías y los accidentes cerebrovasculares (Oliveira *et al.*, 2020), la diabetes mellitus tipo 2, los

trastornos del aparato locomotor (osteoartritis), algunos tipos de cánceres en: endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones, colon (Bruno y Berger 2020) y recientemente se ha asociado al desarrollo de enfermedades cognitivas (T. H. Lee y Yau 2020).

La acumulación de tejido adiposo induce alteraciones metabólicas que están relacionadas con procesos de inflamación y oxidación sistémica, la cual incluye al SNC, por lo que es necesario profundizar en su estudio y en la búsqueda de estrategias terapéuticas

La acumulación del tejido adiposo produce alteraciones metabólicas

Hay dos tipos de tejido adiposo: 1) el tejido adiposo blanco, cuya principal función es el almacenamiento de energía y 2) el tejido adiposo café o también llamado pardo, cuya función metabólica es la oxidación de lípidos para la generación de calor (Esteve Ràfols 2014). En este proyecto, nos enfocamos en el tejido adiposo blanco, el cual es considerado un órgano endocrino por su capacidad de secretar una variedad de péptidos bioactivos (adipocinas), que actúan a nivel local (autocrino/paracrino) y a nivel sistémico (endocrino), con efectos directos en diversas cascadas de señalización (Fantuzzi 2005). Este tejido se compone principalmente de adipocitos y de una fracción estromal vascular que está constituida de células precursoras de adipocitos, de células inmunes (principalmente macrófagos tisulares y linfocitos), así como de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas (Kershaw y Flier 2004). El tejido adiposo blanco se localiza en sitios específicos denominados depósitos adiposos, que se pueden encontrar debajo de la piel (subcutáneo) y alrededor de los órganos (visceral) (Esteve Ràfols 2014).

Cuando se produce un aumento del volumen del tejido adiposo blanco visceral (resultado de la hiperplasia y de la hipertrofia de los adipocitos) por una dieta hipercalórica, se tienen consecuencias adversas tanto a nivel celular como metabólico. La hipoxia del adipocito activa distintas respuestas celulares entre las que se incluyen: proliferación celular, resistencia a la insulina, estrés oxidante, inflamación y apoptosis (Engin 2017). A nivel metabólico, la obesidad favorece la resistencia a la insulina, la hiperglicemia, la dislipidemia, la hipertensión y los estados de estrés oxidante, así como de un estado proinflamatorio y protrombótico generalizado (Kershaw y Flier 2004).

Patofisiología del tejido adiposo en la obesidad

La obesidad es un estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado, donde el tejido adiposo actúa como órgano endocrino y secreta en diferentes concentraciones adipocinas, entre ellas la leptina, la adiponectina, resistina, visfatina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina uno beta (IL-1 β), e interleucina seis (IL-6), entre otras, las cuales participan en el daño metabólico (Esteve Ràfols 2014; Bedi *et al.*, 2019).

Leptina

La leptina es una hormona de 167 aminoácidos. Los adipocitos secretan leptina de manera directamente proporcional a la cantidad de tejido adiposo, siendo mayor en el tejido adiposo blanco visceral. Los receptores a la leptina se expresan tanto en la periferia, en el SNC, así como en los adipocitos (Kershaw y Flier 2004). La leptina tiene efectos sobre la homeostasis de energía, particularmente en el gasto y la ingesta (señalización hipotalámica). Inicialmente fue considerada como una hormona anti-obesidad porque induce una señal metabólica de que hay suficiente energía en el organismo, lo que induce efectos anorexigénicos (suprimen el apetito) y suprimen la producción de neuropéptidos orexigénicos sobre el hipotálamo (Kershaw y Flier 2004).

La leptina es un potente activador de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células NK a través de su señal positiva de supervivencia celular, lo cual contribuye a la inflamación sistémica (Francisco *et al.*, 2018). La expresión y secreción de la leptina también está influenciada por la concentración de otros factores moleculares como por ejemplo: la insulina, TNF- α , estrógenos, y glucocorticoides, entre otros (Maury y Brichard 2010; Francisco *et al.*, 2018).

Adiponectina

La adiponectina es una proteína de 30 KDa. Sus niveles en plasma son inversamente proporcionales a la masa de tejido adiposo, es decir, disminuye su concentración en individuos obesos. Los receptores de la adiponectina son AdipoR1 (se expresa primordialmente en músculo) y AdipoR2 (se expresa primordialmente en el hígado). La activación de AdipoR1 se vincula con la activación de la vía de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) que regula la inhibición de la gluconeogénesis y el incremento en la oxidación de ácidos grasos. El receptor AdipoR2 está involucrado

en la activación de la vía del receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPAR- α), la cual estimula la disipación de la energía al incrementar la oxidación de ácidos grasos e inhibir el estrés oxidante y la inflamación (Van Dijk *et al.*, 2015). La adiponectina incrementa la sensibilidad a la insulina, a través de la reducción de la gluconeogénesis en el hígado y del incremento de la captura de glucosa por el músculo. En conclusión, se considera a la adiponectina como una adipocina anti-obesidad porque incrementa el gasto energético e impide la diferenciación de los adipocitos. Sin embargo, durante la obesidad la disminución en la concentración de adiponectina contribuye a la resistencia a la insulina (T. H. Lee y Yau 2020). La hiperinsulinemia regula negativamente la concentración de adiponectina, donde la disminución de esta hormona produce lipogénesis en el hígado y además, disminuye la oxidación de los ácidos grasos libres (Bedi *et al.*, 2019).

TNF alfa

La proteína TNF- α es considerada una citocina proinflamatoria, la cual es secretada en mayor concentración por los adipocitos durante la obesidad. Esta proteína puede alterar el metabolismo de glucosa e insulina, porque causa resistencia a la insulina por inhibición directa del receptor de insulina (IRS-1, autofosforilación de la subunidad beta sobre residuos de serina) (Hotamisligil *et al.*, 1996). En condiciones fisiológicas, la insulina incrementa la captura de glucosa en los adipocitos, regulando la movilización del transportador GLUT-4 del compartimento citosólico hacia la membrana extracelular del adipocito (Akash, Rehman, y Liaqat 2018). La resistencia a la insulina induce que la glucosa no pueda ser captada por los adipocitos o no de manera eficiente, en consecuencia, incrementa su concentración en la sangre. Esto propicia la condición de hiperglicemia y el páncreas produce más insulina para ayudar a que la glucosa pueda entrar a las células. Estos eventos pueden desencadenar en el individuo la diabetes tipo 2.

La insulina tiene otras funciones adicionales como incrementar la captura de los ácidos grasos libres (FFA), inhibir la lipólisis, regular el crecimiento y participa en la diferenciación de los adipocitos (Cignarelli *et al.*, 2019), por lo que una desregulación de su señal afecta el metabolismo. Por ejemplo, la resistencia a la insulina causa la activación de la enzima lipasa en el hígado, esto produce un incremento en la movilización de grasa, lo que a su vez incrementa la circulación de FFA en el plasma y en el hígado (Bedi *et al.*, 2019).

Los FFA pueden unirse a los receptores tipo Toll cuatro (TLR4), que activan factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (se verá más adelante). Por lo cual la activación de los TLR4 mantienen el ciclo de producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α (B.-C. Lee y Lee 2014).

La proteína TNF- α , cuando se une a su receptor TNFR1, activa a NF- κ B, este es una familia de factores de transcripción inducible, los cuales regulan genes involucrados en procesos inflamatorios. Esta familia está compuesta de cinco miembros incluyendo NF- κ B1 (también llamada p50), NF- κ B2 (también llamada p52), RelA (también llamada p65), RelB y c-Rel, los cuales median la transcripción de genes al unirse a sitios específicos del ADN. Las subunidades de NF- κ B pueden formar homodímeros o heterodímeros. La forma más abundante NF- κ B es el heterodímero p50:p65, y que se encuentra en la mayoría de las células unido a una proteína inhibidora del factor nuclear kappa (I κ B) (T. Liu *et al.*, 2017). NF- κ B permanece inactivo en el citoplasma mientras que está unido a I κ B; sin embargo, cuando I κ B se fosforila, hay un cambio conformacional que permite su ubiquitinación lo que hace sea transportada al proteosoma y se degrade. El heterodímero NF- κ B activo se transloca al núcleo, donde se une a sus secuencias consenso en el ADN y estimula la transcripción de genes específicos, por ejemplo, citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, quimiocinas, moléculas de adhesión, etc. De este modo aumenta el reclutamiento de células inmunes para la propagación de la inflamación y del estrés oxidante (EO) en el tejido adiposo (B.-C. Lee y Lee 2014).

El efecto del TNF- α sobre los adipocitos consiste en suprimir genes que codifican para factores de transcripción involucrados en la adipogénesis y lipogénesis (Kershaw y Flier 2004). En el hígado suprime la expresión de genes involucrados en la recaptura de glucosa y en el metabolismo de oxidación de ácidos grasos, y a su vez TNF- α incrementa la expresión de genes involucrados en la síntesis de *novo* de colesterol y ácidos grasos (Kershaw y Flier 2004). Además, durante la obesidad, la HFD promueve un cambio en la microbiota intestinal, favoreciendo el crecimiento de las bacterias gram negativas (disbiosis). Este cambio produce endotoxemia por el incremento en la circulación de los lipopolisacáridos (LPS), que son el principal componente de las bacterias (Du *et al.*, 2021). El LPS se unen a TLR4 sobre el adipocito el cual activa la vía de señalización Trif/MyD88/ CCL2. CCL2 es una quimiocina que recluta a macrófagos en el tejido adiposo (T. H. Lee y Yau 2020). La activación de los macrófagos produce a su vez citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, entre otras, perpetuando la inflamación.

Generalidades del estrés oxidante en una condición patofisiológica

Es bien conocido que el sobrepeso y la obesidad se caracterizan por un estado de estrés oxidante (EO) (Ahmadinejad *et al.*, 2017). Para comprender mejor la patofisiopatología de la obesidad a continuación se revisarán de manera general los conceptos relacionados con el EO, la definición de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON), los mecanismos de generación y el daño que producen sobre las diferentes biomoléculas, como los ácidos nucleicos, las membranas celulares y las proteínas.

El EO es un estado de desequilibrio en el que se aumenta la producción de las ERON y disminuye la actividad protectora de los sistemas antioxidantes de defensa (Carvajal Carvajal 2019). El EO contribuye a la patogénesis y patofisiología de diversos problemas de salud, como en las enfermedades cardiovasculares, pulmonares, neurodegenerativas, la diabetes, la obesidad y el cáncer (Pizzino *et al.*, 2017; Hauck *et al.*, 2019).

Por otra parte, se define como radical libre a aquella especie química (átomo o molécula) que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos (Aguilar Paredes *et al.*, 2018). Las ERO son las principales moléculas responsables de generar daño oxidante. La molécula de oxígeno es reducida por un electrón, generando el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El radical anión superóxido puede estar en su forma protónica como radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}). A partir de este radical, se puede formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual no es un radical libre; no obstante, se considera un oxidante porque cuando interactúa con metales de transición, se genera el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el radical alcoxilo (RO^{\bullet}) y el radical peroxilo (ROO^{\bullet}) (Gil Hernández 2017).

Las ERO son las principales moléculas que producen EO, sin embargo, no son los únicos. También hay radicales libres que contienen nitrógeno, derivadas del radical óxido nítrico (ON^{\bullet}) y el dióxido de nitrógeno que producen daño oxidante y se conocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN). En conjunto las ERO y las ERN pueden abreviarse como ERON (Carvajal Carvajal 2019). Las ERON tienen una elevada capacidad de reacción, alterando el funcionamiento de los sistemas biológicos (Pryor 1976). Lo que caracteriza a los radicales libres es su baja estabilidad y su alta reactividad, ya que pueden reaccionar entre ellos, y pueden convertir un compuesto no radical en radical, ya sea por pérdida o ganancia de un electrón (Aguilar Paredes *et al.*, 2018).

Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON)

La generación de ERON en los sistemas biológicos puede ser de manera exógena por radiación ultravioleta sobre fotosensibilizadores como: retinol, riboflavina, clorofila, bilirrubina. También de manera endógena, por fuentes intracelulares como subproductos del metabolismo celular. Por ejemplo, en la respiración mitocondrial (cadena de transporte de electrones), por la actividad de proteínas enzimáticas como la monoamino oxidasa, la aldehído oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, y la óxido nítrico sintasa, o bien, por la autooxidación de moléculas citosólicas como catecolaminas, flavinas, quinonas, tioles, difenoles, etc., (Bhat *et al.*, 2015).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial es la principal fuente de generación de radicales libres

La cadena de transporte electrónico mitocondrial está constituida por cuatro complejos multiproteicos embebidos en la membrana interna denominados NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), succinato-ubiquinona oxidorreductasa (complejo II), ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV), además de dos transportadores, la coenzima Q (ubiquinona) y el citocromo c. Los complejos I y II reciben los electrones de la oxidación de NADH y del succinato, respectivamente, y los ceden a la coenzima Q. El complejo III oxida la forma reducida de la coenzima Q y a su vez reduce el citocromo c. Finalmente, el complejo IV acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del oxígeno molecular a agua (Alberts *et al.*, 2014). Durante el transporte de estos electrones, se bombean protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, creándose de este modo un gradiente de protones. Cuando los protones vuelven a entrar a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa, la energía liberada al romper este gradiente impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP (Alberts *et al.*, 2014).

Los $O_2^{\bullet -}$ aparecen en la mitocondria a ambos lados de la membrana mitocondrial; si se produce en la parte exterior se convierte en H_2O_2 por la CuZn superóxido dismutasa (CuZnSOD) y si aparecen en la interior, por la Mn superóxido dismutasa (MnSOD) (Hauck *et al.*, 2019).

El H_2O_2 puede participar en la reacción de Fenton, reacción redox entre un ion metálico reducido y el H_2O_2 , para formar radicales hidroxilo en presencia de iones de cobre o de hierro (Walling 1998; Carvajal Carvajal 2019).

En condiciones fisiológicas y a bajas concentraciones, las ERON actúan como moléculas de señalización, regulan la proliferación, diferenciación y migración celular, promueven la expresión de genes al estimular factores de transcripción y también participan en la apoptosis (Pizzino *et al.*, 2017; Carvajal Carvajal 2019). Sin embargo, cuando hay una sobreproducción conduce al daño de las diferentes biomoléculas como se revisará a continuación.

Las ERON a altas concentraciones son mediadoras del daño a estructuras celulares

Las interacciones de los radicales libres de oxígeno con los constituyentes celulares dan lugar a alteraciones en el metabolismo celular y provocan daños a estructuras celulares formadas por ácidos nucleicos, lípidos y proteínas.

Daño a los ácidos nucleicos

Se conoce que el radical hidroxilo ($-\text{OH}$) reacciona con todos los componentes de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), tanto con las bases nitrogenadas como con las desoxirribosas, causando el entrecruzamiento y la ruptura de las bandas del ADN, esta condición produce alteraciones ya sea temporales o permanentes en el genoma, por ejemplo: inversiones, deleciones, duplicaciones y translocaciones en segmentos de los cromosoma (Sánchez-Flores *et al.*, 2017) El daño oxidante puede constituir el primer paso de mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Valko *et al.*, 2007)

Oxidación lipídica

La oxidación de lípidos denominada también peroxidación lipídica ocurre cuando los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de los lípidos de las membranas. La peroxidación lipídica puede ser iniciada por los radicales hidroxilos (OH^*) y perhidroxilo (HO_2^*). El radical libre abstrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) para neutralizarse en forma de H_2O , lo que genera un radical libre lipídico (L^*). La presencia de un doble enlace en el ácido graso debilita los enlaces C-H del átomo del carbono adyacente a ese doble enlace y, de esta manera, facilita la liberación del átomo de

hidrógeno. El L[•] formado tiende a estabilizarse por medio de un reajuste molecular que produce un dieno conjugado (moléculas con dobles enlaces adyacentes), el cual reacciona con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo (ROO[•]). El ROO[•] puede a su vez abstraer un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica para convertirse en un hidroperóxido y formar un nuevo L[•], que puede reaccionar con otra molécula de oxígeno y así puede establecerse una cadena de propagación de daño oxidante (Hall y Bosken 2009).

La peroxidación lipídica puede tener efectos profundos sobre las funciones celulares porque afecta principalmente a las membranas y produce cambios como la disminución de la fluidez, aumento en la permeabilidad, disminución del potencial de membrana, cambios en las propiedades fisicoquímicas, cambios en la dinámica de interacción lípido-lípido y lípido-proteínas, disminuye la actividad de las enzimas de la membrana, disfunción de los receptores, deterioro del transporte electrónico mitocondrial, modificaciones en el transporte de iones y nutrientes, y la modificación en las vías de señalización que se inician en la membrana (Ighodaro y Akinloye 2018). Los cambios en la permeabilidad permiten la entrada de agua, lo que incluso puede generar la muerte celular por necrosis.

Oxidación proteica

La oxidación de las proteínas produce alteraciones estructurales como entrecruzamiento, fragmentación, y fenómenos de agregación (mediados por la formación de puentes disulfuro). Estas alteraciones estructurales conducen a la disminución o pérdida de sus funciones. La susceptibilidad de las proteínas al daño por radicales libres dependerá de su composición de aminoácidos. Las moléculas que poseen dobles enlaces o que contienen grupos sulfhídrido pueden sufrir fácilmente el ataque de los radicales libres. Las proteínas con gran proporción de los aminoácidos como triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína son las más susceptibles (Hauck *et al.*, 2019). La magnitud del daño oxidante dependerá de si estos aminoácidos forman parte de grupos funcionales responsables de la actividad de la proteína, ya sean proteínas estructurales, enzimáticas o proteínas de membrana (transportadores, receptores y/o canales iónicos) (Gil Hernández 2017).

Estrés oxidante y señalización celular en la biología del tejido adiposo

En la biología del tejido adiposo, la obesidad se correlaciona positivamente con el incremento de las ERON y se vincula con la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico, y resistencia a la insulina. (Hauck *et al.*, 2019).

La familia de enzimas NADPH oxidasas (NOX) catalizan la reducción de oxígeno molecular para producir el anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Esta familia de enzimas se activa cuando los animales son alimentados con una HFD. En los adipocitos se expresa NOX4 y puede ser activado por citocinas proinflamatorias como IL-1 β , lo cual incrementa la producción de ERON en el citosol de los adipocitos (Hauck *et al.*, 2019). Así mismo, cuando el medio de cultivo de adipocitos murinos se enriquece con altas concentraciones de glucosa y con ácidos grasos saturados, hay un incremento la expresión de NOX4 y de ERON (Hauck *et al.*, 2019). Los macrófagos del tejido adiposo expresan NOX2 y éste es activado en respuesta a agonistas como LPS y ácidos grasos saturados.

Otra fuente de producción de ERON en los adipocitos es causada por la enzima ERO1 (del inglés, endoplasmic reticular oxidoreductin1). ERO1 es una enzima del retículo endoplásmico que produce peróxido de hidrógeno como consecuencia del plegamiento de proteínas y su secreción, por lo tanto su actividad es una fuente de producción de ERON intracelulares (Hauck *et al.*, 2019).

El exceso de ERON mitocondriales causa disfunción mitocondrial en el tejido adiposo

La disfunción mitocondrial está involucrada en algunos síntomas de la obesidad como baja generación de energía y la presencia de marcadores inflamatorios. Las mitocondrias de individuos obesos tienen menor capacidad de generación de energía, se observan cambios morfológicos en su membrana interna al verse menos definidas y hay una reducida capacidad de oxidación de los ácidos grasos. En el adipocito las vías metabólicas están alteradas: la adipogénesis, la lipólisis, la esterificación de ácidos grasos y la producción de adiponectina; todos estos factores en conjunto cambian la sensibilidad a la insulina (de Mello *et al.*, 2018).

La mitocondria es un organelo que tiene como función primaria producir energía para las células en forma de ATP. Sin embargo, no es la única función, también produce ERON que funcionan como moléculas de señalización de daño celular. La mitocondria es la mayor fuente de ERON, las cuales contribuyen al EO en el tejido adiposo. Este incremento conduce a la disfunción mitocondrial que se define como una mala respuesta adaptativa, lo que produce irregularidades en la función de las proteínas incluyendo proteínas de la cadena respiratoria. Además, ocurren cambios en los amortiguadores de calcio, daño al ADN mitocondrial y a sus membranas lipídicas, se observan cambios en el tamaño de las mitocondrias y puede haber apoptosis (de Mello *et al.*, 2018). Las mitocondrias de los adipocitos de individuos obesos están sobrecargadas de glucosa y de ácidos grasos, esto incrementa la concentración de la molécula acetil coenzima A, en consecuencia, incrementa NADH del ciclo de Krebs, hay mayor disponibilidad de electrones para la cadena respiratoria, lo cual conduce a mayor producción de ERON. El exceso de producción de ERON activa el factor de transcripción NF- κ B que produce citocinas proinflamatorias y exagera la inflamación del tejido adiposo (de Mello *et al.*, 2018b).

Las ERON producidas en la mitocondria estimulan la liberación de citocromo c. La interacción de las ROS sobre la proteína cardiolipina, causa la disociación del citocromo c con la membrana interna de la mitocondria y permite que salga al espacio citosólico de la célula y se activa la vía intrínseca de apoptosis (Ott *et al.* 2007). Las concentraciones de proteínas pro-apoptóticas están incrementadas en roedores y en individuos obesos. La apoptosis puede ser inducida por el estrés oxidante y por el estrés del retículo endoplásmico (de Mello *et al.*, 2018). La hipoxia disminuye la producción de ATP en la mitocondria y esta disminución puede ser también causa de la apoptosis y necrosis (Yin *et al.*, 2009).

El cerebro durante la obesidad: mecanismos que promueven neuroinflamación y estrés oxidante

Investigaciones recientes han encontrado una asociación entre la obesidad y diversas afecciones del funcionamiento cerebral, como apneas, desorden bipolar y ansiedad, además de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Barnham, Masters, y Bush 2004; Pugazhenthii, Qin, y Reddy 2017). El sobrepeso y la obesidad conducen al desarrollo de una inflamación sistémica de bajo grado, de EO y de disfunción mitocondrial en el sistema periférico. En décadas recientes, cada vez más trabajos confirman que también ocurren daños en el SNC (Pugazhenthii, Qin, y Reddy 2017). En este proyecto nos enfocamos en la asociación entre la obesidad y la disfunción cognitiva, por lo que la introducción se enfoca principalmente en el daño a las regiones del cerebro vinculadas al aprendizaje y la memoria.

Barrera hematoencefálica y neuroinflamación

Los procesos de inflamación sistémica y de EO en la periferia (sistémica) repercuten en el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), y activan a la microglia, es decir, a los macrófagos residentes del SNC. Diversos estudios han demostrado una correlación entre la inflamación sistémica y la disfunción cognitiva (Tanaka *et al.*, 2020).

Recientemente, se ha demostrado que la obesidad disminuye la integridad de la BHE, esto permite que tanto las citocinas proinflamatorias y los ácidos grasos esterificados atraviesen la BHE y activen a la microglia (Tucsek *et al.*, 2014). En un estudio realizado por Freeman y Granholm (2012), demostró la disminución de la integridad de la BHE en el hipocampo de ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol y grasas saturadas. En el estudio de Drake *et al.* (2011) se encontró una mayor infiltración de los leucocitos activos (marcados con CD45) al SNC en ratones obesos, además de un incremento en las moléculas de adhesión VCAM en plexos coroideos de los ventrículos laterales de la *fimbria hippocampi* hasta el área caudal de los ventrículos. Davidson *et al.* (2012), mostraron en un modelo de ratas con una alimentación alta en grasa y sacarosa que se incrementó la permeabilidad de la BHE del hipocampo, a través de una prueba en la que utilizaron sodio fluorescente. Todas estas evidencias confirman el daño y el incremento de la permeabilidad de la BHE provocado por la obesidad.

La activación de las células gliales como los astrocitos y la microglia son una pieza clave en la neuroinflamación. Una de las vías de activación de estas células es a través del receptor TLR4, el cual es activado por FFA y también por LPS (Pugazhenthii, Qin, y Reddy 2017). Una vez activado este receptor, se desencadena la vía de señalización inflamatoria a través de las proteínas MyD88, TRAF6, TAK1, p38 y NF- κ B, lo cual promueve la producción de más citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 entre otras dentro del SNC (E.-B. Kang *et al.*, 2016).

La citocina TNF- α es un elemento clave en la neuroinflamación, ya que contribuye en el deterioro cognitivo al activar a la microglia, la cual a su vez produce más citocinas proinflamatorias. El TNF- α contribuye en la enfermedades neurodegenerativas desmielinizantes (Fischer *et al.*, 2011). La vía de señalización del TNF- α involucra a dos receptores TNFR1 y TNFR2. El receptor TNFR1 se localiza en las neuronas y cuando es activado produce daño axonal y neuronal por sus efectos proinflamatorios. El receptor contiene un dominio de muerte el cual media la señal apoptótica (Fischer *et al.*, 2011). Spagnuolo *et al.* (2015) mostraron el aumento en la concentración del mediador proinflamatorio TNF- α en el hipocampo en un modelo murino de obesidad.

El hipocampo es una zona rica en microglia además de ser una de las estructuras cerebrales más afectadas como consecuencia de la neuroinflamación y del EO que deriva de la obesidad. Rivera *et al.* (2013) desarrollaron un protocolo con ratas Wistar que fueron alimentadas con HFD (60%) durante 13 semanas evaluando astrogliosis y microgliosis a través de los marcadores GFAP e Iba-1, respectivamente. Observaron que en la región del hipocampo estos marcadores estaban altamente expresados en comparación con las ratas alimentadas con una dieta estándar. Además, demostraron que incrementó el número de células pro-apoptóticas (células positivas a pro-caspasas) y apoptóticas (células positivas a caspasas) en las regiones del giro dentado, de CA1 y CA3 comparado con ratas alimentadas con una dieta estándar.

Parte de la evidencia por la cual la obesidad está asociado con un deterioro de las funciones cognitivas es que durante la obesidad disminuyen los marcadores sinápticos y la densidad de espinas dendríticas de las neuronas (Bocarsly *et al.*, 2015). También Vuong y colaboradores demostraron que disminuye la densidad de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo en un modelo murino de obesidad (Vuong *et al.*, 2017).

Las regiones del giro dentado y la zona ventricular del hipocampo son regiones que se caracterizan por presentar neurogénesis, es decir, ocurre la proliferación de células neuroprogenitoras y su diferenciación a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En modelos animales de obesidad y diabetes se ha reportado el daño en la neurogénesis así como una disminución de BDNF (Lang *et al.*, 2009; Pugazhenthii, Qin, y Reddy 2017). La dieta alta en grasa daña la neurogénesis en el hipocampo de roedores, incrementa la peroxidación lipídica y disminuye la molécula BDNF (Park *et al.*, 2010).

Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el cerebro

El cerebro es un tejido que se caracteriza por su alto consumo de oxígeno, sus relativamente bajos niveles de antioxidantes, su alta tasa metabólica y la entrecorrida baja capacidad de regeneración, lo que hacen al tejido cerebral susceptible al daño oxidante. Las ERON son producidas por diferentes vías que incluyen la interacción directa entre los metales y el oxígeno. Se producen por la reacción de Fenton y la de Haber-Weiss o por vías indirectas que involucran la activación de calcio de metaloenzimas como la sintasa de óxido nítrico o la xantina oxidasa. El cerebro es un órgano que concentra metales iónicos, y se sugiere que la ruptura en la homeostasis de los metales es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades neurodegenerativas (Barnham, Masters, y Bush 2004).

Las ERON producidas en las células del cerebro, generan peroxidación lipídica de las membranas, como consecuencia se producen metabolitos tóxicos como malondialdehído (MDA), acroleína y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), que van a interactuar con proteínas modificando las cascadas de señalización (Paredes *et al.*, 2018). Las ERON producen excitotoxicidad por fallo en la recaptura de glutamato y daño a la neurona por la mala regulación de la señalización de calcio, por la inhibición de la expresión de los transportadores de glucosa, ya que estos afectan a las ATPasas de Na^+/K^+ que mantiene el potencial eléctrico de membrana y finalmente porque estimulan a la cascada de señalización apoptótica (Barnham, Masters, y Bush 2004).

En un estudio desarrollado por Fischer *et al.* (2011) en neuronas co-cultivadas con peróxido de hidrógeno disminuyó la viabilidad celular probablemente por apoptosis (medido por la técnica de TUNEL). Ma *et al.* (2014) reportaron el incremento en la producción de ERON en el cerebro y plasma en las ratas que fueron alimentadas con HFD.

En el trabajo de D. H. Kang *et al.* (2015) mostraron en un modelo murino que la HFD produce neuroinflamación y EO, ya que los animales con HFD presentaron un incremento en el número de células apoptóticas en la región CA3 del hipocampo. Así mismo, mostraron que incrementó la expresión de TLR4, ciclooxigenasa-2 (COX-2), y de la enzima de óxido nítrico inducible (iNOS) en el giro dentado y en la región CA3.

La disfunción mitocondrial en el SNC es otro vínculo fundamental entre la obesidad y el deterioro cognitivo. El ADN mitocondrial oxidado por la alta producción de ERON cuando es liberado al citosol de la célula induce la formación del inflamosoma al unirse directamente con NLRP3, el cual es un complejo multiproteico citosólico que conduce a la activación de caspasa-1 y a la secreción de citocinas proinflamatorias (Shimada *et al.* 2012). El inflamosoma también se puede formar por el estrés mitocondrial causado por cambios en las concentraciones de calcio (Pugazhenthii, Qin, y Reddy 2017).

Funciones cognitivas: Aprendizaje y memoria

El aprendizaje es el proceso mediante el cual adquirimos nueva información del entorno o de nosotros mismos. La memoria se puede definir como la retención a corto y largo plazo de la información dependientes de la experiencia (Navarrete *et al.*, 2008). En los procesos de aprendizaje y memoria se incluyen el aprendizaje asociativo, espacial o no espacial y la memoria a corto y largo plazo entre muchos otros (Navarrete *et al.*, 2008; Paul, Magda, y Abel 2009). La memoria se puede clasificar en dos tipos principales: memoria implícita (no declarativa) y explícita (declarativa). La memoria implícita es la resultante de procesos de aprendizaje no consciente realizados a través de hábitos y habilidades, mediante estimulación o sensibilización previa, así como en los que interviene la musculatura esquelética o bien respuestas emocionales y de aprendizaje no asociativo. La memoria explícita o declarativa engloba la retención del conocimiento de acontecimientos, lugares o hechos, y depende del lóbulo medio temporal del diencefalo. Esta información se retiene mediante un esfuerzo consciente y a través de asociaciones nuevas (Quillfeldt 2016). La adquisición de la memoria implícita o explícita es un proceso que requiere tres fases: 1) Codificación o adquisición: se refiere a la captación sobre los estímulos y el entorno y su asociación entre ellos o con estímulos previos, 2) Consolidación: que es el proceso de almacenamiento o retención de la información a lo largo del tiempo y 3) Recuperación: que consiste en recordar la información retenida para crear una representación del suceso o para ejecutar una respuesta motora aprendida (Domjan 2014).

La memoria de reconocimiento es la habilidad para discriminar entre la novedad y la familiaridad de las cosas previamente experimentadas. El proceso de reconocimiento tiene dos componentes funcionales. El primero basado en el reconocimiento de la familiaridad de los estímulos y el segundo en el recuerdo de la información espacio-temporal (contextual) de los eventos. El hipocampo es indispensable para la consolidación de la memoria de estímulos dentro de un contexto espacio-temporal específico o memoria episódica (Balderas et al. 2008).

Pruebas conductuales

La investigación con pacientes presenta limitaciones que hace imprescindibles los estudios experimentales con modelos animales como primates, ratas y ratones, cuyos procesos cognitivos son

similares a los humanos. Hay diferentes pruebas de conducta usadas en animales de experimentación para la evaluación del aprendizaje y la memoria (Paul, Magda, y Abel 2009).

Los laberintos son los dispositivos que se utilizan con frecuencia para evaluar el aprendizaje y la memoria en roedores. El fundamento se basa en que los animales son capaces de aprender y recordar la localización de recursos como refugio, alimento, agua, o alguna otra recompensa, a través de señales visuales-espaciales (Paul, Magda, y Abel 2009)

Prueba de reconocimiento de un objeto novedoso (PRON)

La PRON requiere de habilidades cognitivas como la identificación, la comparación y la discriminación de objetos (Balderas *et al.*, 2008). Las pruebas de memoria de reconocimiento involucran tres fases. Primero la fase de habituación donde el animal se familiariza con el entorno y con el dispositivo donde se llevará a cabo la prueba. Segundo, la fase de adquisición, la cual consiste en presentar los estímulos y adquirir la información, en este caso dos objetos idénticos. Posteriormente hay un intervalo de retención, no se presentan ni estímulos previos ni nuevos. Tercero, la fase de elección, se presenta un estímulo a elegir donde el sujeto compara la información previamente almacenada con el actual estímulo (estímulo novedoso). Si el animal recuerda el estímulo previamente presentado entonces explorará durante más tiempo el objeto novedoso (Steckler *et al.*, 1998).

Prueba de reconocimiento de un objeto en contexto (PROC)

La PROC fue diseñada Balderas *et al.* (2008) basándose en la tendencia a explorar un objeto familiar en un contexto novedoso, donde la asociación entre los objetos y las claves ambientales donde se encuentran son los estímulos predominantes a recordar. La tarea de objeto en contexto está basada en la asociación de un estímulo con su contexto específico y para esto el sujeto necesita recordar “dónde” experimentó previamente el estímulo. En esta prueba, tanto los objetos como el contexto, deben ser familiares en la prueba de memoria, la única información novedosa es la relación entre ellos. Las ratas exploran durante más tiempo el objeto familiar que es presentado en un contexto novedoso, que el objeto familiar en un contexto en el cual ya había sido presentado previamente. En esta prueba se evalúa el tiempo de exploración de ambos objetos.

Memoria espacial: Laberinto acuático de Morris

La memoria espacial es la capacidad de reconocer el arreglo de objetos o de rutas específicas en el entorno (Paul, Magda, y Abel 2009). Una de las pruebas conductuales más utilizadas para el estudio de la memoria espacial es el laberinto acuático diseñado por Morris (1984). La prueba se desarrolla en una piscina circular dividida en cuatro cuadrantes imaginarios, en uno de los cuales se dispone de una plataforma de escape sumergida 1 cm de la superficie del agua. Alrededor de la piscina se colocan señales visuales que facilitan la orientación espacial del animal (**Figura 1**). En la fase de adquisición, se introduce al animal con el hocico apuntando hacia las paredes de la piscina y se permite que nade libremente hasta que encuentre la plataforma y escape del agua, en caso contrario, se le coloca sobre esta. Después se retira al animal de la plataforma y se le deja descansar antes del siguiente ensayo. La capacidad del animal para localizar eficientemente la plataforma depende de la utilización de las claves que rodean la piscina, esta fase de adquisición o aprendizaje puede durar varios días. Finalmente el día de la prueba se retira la plataforma de la piscina, y se evalúa el tiempo de exploración en el cuadrante donde se localizaba la plataforma (Navarrete *et al.*, 2008).

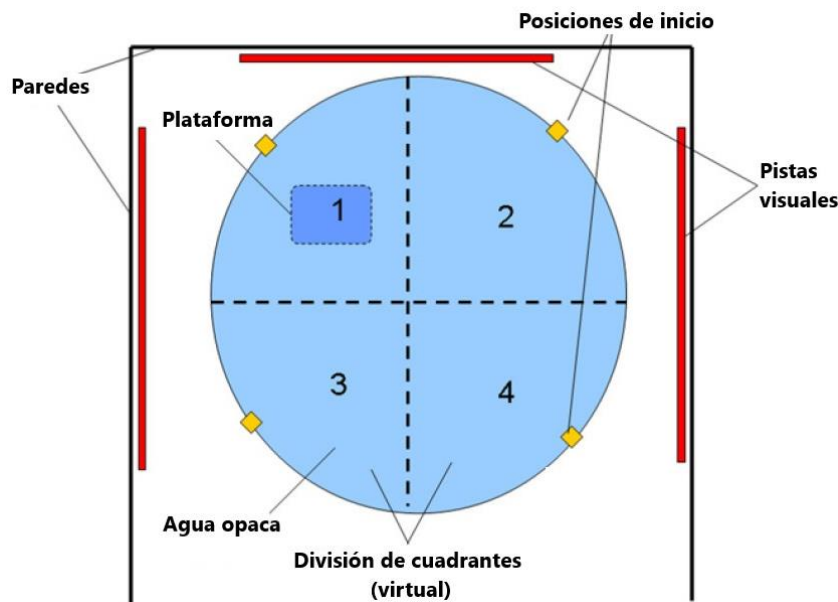


Figura 1 Representación del laberinto acuático de Morris. Tomado y modificado de Paul 2009.

Uso de antioxidantes para disminuir las alteraciones cognitivas observadas durante la obesidad

Sistemas de defensa antioxidante

Los organismos poseen diversos sistemas antioxidantes que trabajan para mantener la homeostasis redox celular y proteger a los sistemas biológicos frente a los efectos perniciosos de las reacciones que causan oxidación excesiva. Un antioxidante es una sustancia capaz de prevenir o retrasar la oxidación de un sustrato oxidable (Carvajal Carvajal 2019). Los sistemas antioxidantes actúan al evitar la formación de radicales libres, así como de bloquearlos o al capturarlos.

Clasificación

Los sistemas de defensa antioxidantes de origen endógeno pueden ser de naturaleza enzimática y no enzimática. Los antioxidantes enzimáticos son proteínas de alto peso molecular, mayor a 10 KDa, como: las enzimas superóxido dismutasas (SOD), la catalasa (CAT), las enzimas glutatión peroxidasas (GPx) y la enzima glutatión reductasa (GR) (Paredes et al. 2018). Los sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos pueden ser incorporados a través de la dieta. Suelen ser moléculas de bajo peso molecular (menores a 1KDa) como: la vitamina C, el ácido ascórbico, la vitamina E (tocoferol), los carotenoides, las antocianinas, los polifenoles, entre otros (Paredes *et al.*, 2018).

Antioxidantes endógenos

Las enzimas **SOD** son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación (un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido) del $O_2^{\bullet-}$ para producir H_2O_2 y O_2 (**Figura 2**). Se han encontrado niveles de SOD más altos en hígado, glándulas suprarrenales, riñón y bazo. La velocidad de dismutación enzimática es 10^4 veces superior a la dismutación espontánea. Este grupo de enzimas poseen una variedad de grupos prostéticos (Torres 2002; Gil Hernández 2017).

La CuZnSOD o SOD1 es una proteína dimérica de 32 KDa. El átomo de cobre es esencial para la actividad catalítica de esta enzima, mientras el átomo de zinc le proporciona estabilidad. La SOD1 se localiza mayoritariamente en el citosol de las células eucariotas. También puede estar presente en el núcleo, los lisosomas, los peroxisomas y el espacio intermembranal mitocondrial. Hay una segunda isoforma de la

CuZnSOD, la cual es una proteína de localización extracelular y se conoce como SOD3 (Torres 2002; Gil Hernández 2017; Paredes et al. 2018).

La MnSOD o SOD2 es una proteína tetramérica de cuatro subunidades idénticas, con peso molecular de 88 KDa y se localiza en la matriz mitocondrial. La SOD2 neutraliza al radical anión superóxido producido durante el transporte electrónico mitocondrial (Torres 2002; Gil Hernández 2017; Paredes et al. 2018).

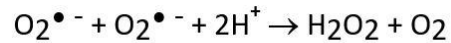


Figura 2 Reacción de la enzima superóxido dismutasa.

La **CAT** es una hemoproteína que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua (**Figura 3**). Esta enzima consta de cuatro subunidades, que contiene cada una un grupo hemo que forma parte de su centro activo y, tiene un peso molecular de 240 KDa. La CAT de las células eucariotas se localiza fundamentalmente en los peroxisomas (Torres 2002; Gil Hernández 2017; Paredes et al. 2018) aunque también puede encontrarse en otros sitios de la célula.

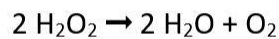


Figura 3 Reacción de la enzima catalasa.

Las enzimas **GPx** son una familia de enzimas dependientes de selenio y pertenecen a la familia de las peroxidasas que catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos empleando el glutatión (GSH) como sustrato donador de 2H. El GSH se oxida pasando a glutatión oxidado (GSSG) (**Figura 4**). Se conocen tres enzimas: GPx-c, GPx-p y GPx-PH. Las enzimas GPx-c y GPx-p son proteínas tetraméricas que contienen cuatro átomos de selenio, mientras que GPx-PH es monomérica. Las GPx se localizan fundamentalmente en el citosol de las células eucariotas, aunque también puede encontrarse en las mitocondrias. Si bien la CAT y la GSH-Px son enzimas que reducen el H₂O₂, sus mecanismos de regulación son diferentes, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂

mientras que la GSH-Px actúa a bajas concentraciones (Lawrence y Burk 1976; Cisneros Prego, Pupo Balboa, y Céspedes Miranda 1997).



Figura 4 Actividad de la enzima glutatión peroxidasa.

La enzima **glutatión reductasa** (GR) tiene un requerimiento absoluto de GSH para funcionar. La principal enzima responsable de mantener elevada la relación GSH/GSSG es la enzima glutatión reductasa. Esta enzima cataliza la reducción del GSSG utilizando equivalentes redox en forma de NADPH. La enzima glutatión reductasa tiene un peso molecular de 120 KDa, se conforma de dos subunidades cada una de ellas con un grupo FAD en su centro activo. Su localización es citosólica y mitocondrial (Gil Hernández 2017; Paredes et al. 2018; Torres 2002).

Antioxidantes no enzimáticos

Hay otro sistema de defensa antioxidante que funciona sin intervención enzimática. En este caso, los antioxidantes no enzimáticos donan un electrón o un electrón y un protón (un hidrógeno completo) a los radicales libres que escapan de las enzimas antioxidantes. En este sistema, se encuentran diversas moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides y los polifenoles. Estos antioxidantes se obtienen principalmente a través de la dieta (Gil Hernández 2017; Pizzino et al. 2017). En esta revisión hacemos énfasis en los antioxidantes glutatión y en los polifenoles.

El tripéptido GSH, gamma-glutamyl-cisteína-glicina (**Figura 5**), constituye el tiol de bajo peso molecular más abundante de las células de mamíferos. El GSH puede reaccionar con los radicales libres de oxígeno de diferentes maneras. Primero, mediante la acción de la enzima glutatión peroxidasa puede reducir especies como el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos formando el GSSG. Segundo, puede reaccionar directamente con radicales libres como: radical anión superóxido, radical hidroxilo, y de radical alcoxilo, donando un átomo de hidrógeno y formando un radical tiol, que posteriormente puede formar un puente disulfuro dando lugar al GSSG. Tercero, puede reaccionar con electrófilos para formar

aductos covalentes mediante reacciones catalizadas por las enzimas glutatión transferasas (Torres 2002; Pizzino *et al.*, 2017; Gil Hernández 2017; Paredes *et al.*, 2018; Carvajal Carvajal 2019).

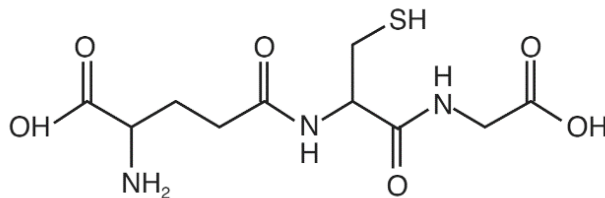


Figura 5 Estructura de la molécula antioxidante endógena no enzimática glutatión reducido (GSH). Esta molécula es un tripéptido no proteico constituido por 3 aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina, el grupo tiol (SH) actúa como donador de electrones, en su forma oxidada se convierte en disulfuro de glutatión (GSSG). Tomado de la web.

Los **polifenoles** son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal que están formados por uno o más anillos fenólicos. Se conocen más de ocho mil polifenoles, clasificados en 16 clases. Las clases más conocidas son los estilbenos, lignanos, ácidos fenólicos, y flavonoides (Y. Kim, Keogh, y Clifton 2016; Gil Hernández 2017). Los polifenoles son considerados agentes antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, antivirales y anticarcinogénicos (Y. Kim, Keogh, y Clifton 2016; Zhou *et al.* 2016). Los polifenoles pueden actuar como antioxidantes tanto en fase acuosa como lipofílica. Los flavonoides son el grupo de compuestos polifenólicos más abundante, desde el punto de vista estructural tiene un anillo bencénico inserto en un anillo heterocíclico, contribuyen a la regulación del estado redox celular. Los polifenoles, son moduladores en la cascada de eventos asociados con las respuestas inflamatorias. De manera general inhiben la actividad de enzimas proinflamatorias (COX-2, la lipoxigenasa LOX, y la iNOS), inhiben al NF- κ B y de la proteína activadora 1 e incrementan la activación de enzimas antioxidantes (Y. Kim, Keogh, y Clifton 2016; Yahfoufi *et al.*, 2018; Di Meo *et al.* 2020).

Silybum marianum

Silybum marianum (cardo mariano) es una planta que se distribuye principalmente en Asia y Europa, pertenece al género *Silybum* y a la familia *Asteraceae*. El término silimarina se ha empleado para hacer referencia al extracto estandarizado del fruto y las semillas de la planta. Aproximadamente del 70 al 80% del extracto lo componen los flavonolignanos como silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silidianina, silicristina, isosilibina, dehidrosilibina, deoxysilicristina, deoxysilidianina, silandrina, silybinoma, silyhermina, silyamandina y neosilyhermina (**Figura 6**). En menor fracción está compuesta de flavonoides como quercetina, (+)-taxifolina y kaempferola (Trouillas *et al.*, 2008).

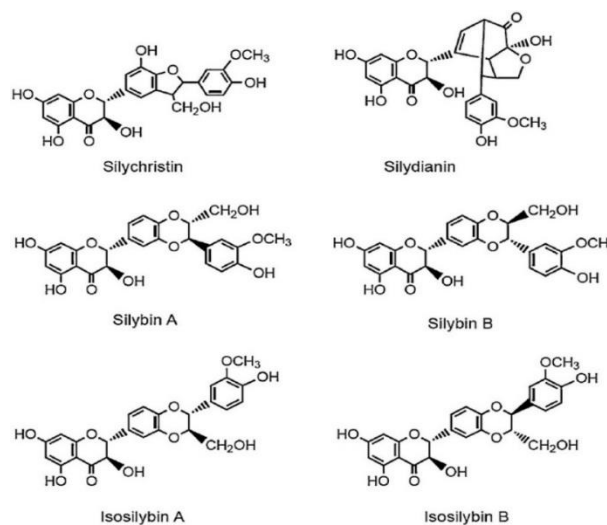


Figura 6 Planta silimarina y composición del extracto estandarizado. Tomado de Tajmohammadi, Razavi, y Hosseinzadeh 2018.

La silimarina ha sido utilizada desde la época de los griegos para tratar enfermedades, principalmente del hígado. También se ha identificado muy bien que la planta se caracteriza por tener actividad antiinflamatoria y antioxidante (Viktorova *et al.*, 2019).

Efectos de la silimarina sobre el control de la glicemia

La silibina, el mayor componente del extracto de la silimarina, interfiere con algunos mecanismos de acción de la insulina y disminuye la resistencia a esta molécula. Además, mejora la sensibilidad a la

leptina, modula la recaptura de glucosa en adipocitos, bloquea el GLUT4, disminuye la acumulación de tejido adiposo visceral e inhibe la gluconeogénesis en el hígado (Z.-W. Wang 2008; Tajmohammadi, Razavi, y Hosseinzadeh 2018).

Propiedades antioxidantes de la silimarina

En diversos protocolos de investigación clínica con pacientes y en modelos animales se ha documentado que la silimarina tiene un efecto protector contra el EO, ya que puede inhibir la formación de ERON y restaura las concentraciones de enzimas antioxidantes. Así mismo se ha demostrado que la silimarina modula la inflamación (Yamasaki *et al.*, 2017).

Efecto antioxidante de la silimarina

Los grupos hidroxilo y nitrógeno de la silimarina actúan como donadores de electrones, por lo que neutralizan a las ERON. Así mismo, forma aductos con los radicales, previene la oxidación de proteínas, disminuye la peroxidación lipídica, estabiliza la membrana mitocondrial, e inhibe la activación de NF- κ B. También, modula la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GSH-Px y GR (Trouillas *et al.*, 2008; Tajmohammadi, Razavi, y Hosseinzadeh 2018; Pignatelli, Carnevale, y Menichelli 2019). La silimarina tiene un efecto antidiabético debido a su efecto anti-oxidante, anti-inflamatorio, y el mecanismo es a través de la inhibición de la expresión de la NADPH oxidasa y la activación de NF- κ B (Feng *et al.*, 2016).

Uso de la silimarina en el SNC

Las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple afectan principalmente a las neuronas por el fallo en la trasmisión de la información, por la disfunción mitocondrial, y por el daño secundario del EO y de la neuroinflamación (Borah *et al.* 2013). Las enfermedades neurodegenerativas representan un gran sufrimiento humano por ser incurables y por los grandes costos económicos que conllevan. Muchos compuestos de plantas medicinales como los polifenoles, alcaloides y terpenos tienen propiedades terapéuticas (Pérez-Hernández *et al.* 2016). Los polifenoles son los compuestos bioactivos más comunes de las plantas y vegetales consumidos por los humanos (Lu *et al.* 2009; Borah *et al.* 2013; Pérez-H *et al.* 2014).

Si bien el efecto protector de la silimarina se comenzó a estudiar inicialmente como protector del daño del metabolismo periférico, recientemente surgió la pregunta si esta planta podía tener efectos protectores en enfermedades neurodegenerativas. Song *et al.* (2018) evidenciaron a través de la técnica de HPLC que la silibina se encuentra presente en el líquido cefalorraquídeo de ratas Sprague Dawley en un modelo de Alzheimer en los que inyectaron el péptido beta-amiloide.

Cada vez hay más evidencia del efecto neuroprotector de la silimarina en diferentes modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas. Galhardi *et al.* (2009) mostraron que el tratamiento de la silimarina en ratas envejecidas a una dosis de 400 mg/kg durante tres días incrementó la concentración del GSH y la actividad de la enzima antioxidante SOD.

En modelos murinos experimentales de la enfermedad de Alzheimer en los que inyectaron el péptido beta-amiloide, el tratamiento con silibina disminuyó los niveles del MDA en el hipocampo (Haddadi, Shahidi, y Eyvari-Brooshghalan 2020). Además, la silimarina incrementa los niveles de BDNF en modelos murinos HFD, esto podría estar asociado con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias al reducir las citocinas proinflamatorias en el hipocampo y la corteza cerebral (Yön, Belviranlı, y Okudan 2019). La silimarina inhibe la expresión de proteínas asociadas con la neuroinflamación como iNOS, COX-2, mieloperoxidasa, NF- κ B y citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α evitando la neurodegeneración asociada con la isquemia (Hou *et al.*, 2010). Por estas propiedades, la silimarina podría ser un probable agente terapéutico para prevenir el deterioro cognitivo asociado a la neuroinflamación inducida por obesidad.

3. Planteamiento del problema

La obesidad constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo por sus efectos deletéreos en múltiples órganos y sistemas (Tanaka et al. 2020). Se prevé que para 2030 habrá 1.35 billones y 573 millones de personas adultas con sobrepeso y obesidad respectivamente en el mundo (OMS). México forma parte de la pandemia en la cual actualmente más del 70% de la población padece sobrepeso u obesidad (ENSANUT, 2018). Es importante profundizar en la comprensión de la obesidad y sus complicaciones, así como en la búsqueda de tratamientos para contrarrestar estas afecciones. En este trabajo de investigación nos preguntamos si la alimentación con una dieta alta en grasa (54% de lípidos) durante 14 semanas y el tratamiento subcrónico de silimarina (200 mg/Kg) durante 14 días tienen un efecto en el metabolismo de glucosa, en la función cognitiva (aprendizaje y memoria) y en la condición de EO en el cerebro de ratas jóvenes macho Wistar. En este trabajo se estudió: 1) si el modelo de inducción de obesidad repercute en el metabolismo de la glucosa y si el tratamiento con silimarina mejora los niveles de glucosa en sangre, 2) si el modelo de inducción de obesidad repercute en el estado cognitivo y si la silimarina lo puede revertir 3) si hay cambios en el balance óxido-reducción en el cerebro HFD en presencia o ausencia de silimarina.

4. Hipótesis

La silimarina mejorará el estado metabólico, cognitivo y oxidativo de las ratas sometidas a una dieta alta en lípidos.

5. Objetivos

General

Evaluar el efecto de la silimarina en los cambios metabólicos periféricos, el estado cognitivo y oxidante en el sistema nervioso central en un modelo murino de obesidad.

Específicos

1. Determinar el efecto de la silimarina sobre la ganancia de peso corporal provocada por la HFD.
2. Conocer el efecto de la silimarina sobre la tolerancia a la glucosa inducida por la HFD.
3. Evaluar el efecto de la silimarina sobre el deterioro del aprendizaje y la memoria inducido por la HFD.
4. Evaluar el efecto de la silimarina sobre el estado de EO en el SNC inducido por la HFD.

6. Metodología

Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 250-300 g de peso corporal, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se mantuvieron en grupos de 4 en cajas de acrílico en un ambiente controlado a una temperatura de 22° C con un ciclo de luz/oscuridad 12:12, luces encendidas a las 7:00 horas. Alimentados con dieta de laboratorio estándar Chow (LABDIET, laboratory autoclavable rodent diet 5010) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron apegados a la ley mexicana de protección animal (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-2001). El Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, UNAM, aprobó todos los procedimientos experimentales (Aprobación No. 111/2014).

Inducción de la obesidad

Dos grupos de animales fueron alimentados con dieta alta en grasa durante 14 semanas, permitiéndoles libre acceso (24 h/día) a la misma para inducir obesidad, la cual, suponemos, debería provocar un estado de inflamación y EO sistémico crónico que repercutiría en el SNC. La dieta alta en grasa (HFD) fue preparada en el laboratorio y se compone de 54% de grasa, 30% carbohidratos y 15% proteína (**Tabla 1**). Cada semana los animales fueron pesados el mismo día a la misma hora.

Tabla 1 Características de la dieta

Tipo de dieta	Contenido calórico	Calorías de macronutrientes
CHOW	3.42 Kcal/g	12 % Grasa 58 % Carbohidratos 28 % Proteína
HFD	5.56 Kcal/g	54 % Grasa 30 % Carbohidratos 15 % Proteína

Tratamiento de silimarina

Después de 12 semanas de dieta, dos de los cuatro grupos experimentales recibieron diariamente (a las 09:00 hrs) 200 mg/kg de silimarina (Sigma Aldrich) por vía oral usando una sonda intragástrica durante 14 días, la cual fue disuelta en aceite vegetal (0.5 ml). La dosis fue seleccionada con base a trabajos

previos en los que se ha documentado efectos neuroprotectores (Lu *et al.*, 2009; Pérez-H *et al.*, 2014) (Figura 7). Los otros dos grupos recibieron solo aceite vegetal (0.5 ml).

Diseño experimental

En el presente trabajo se emplearon cuatro grupos experimentales con una n de 25 a 30 por grupo. Para las pruebas conductuales y bioquímicas se utilizaron diferentes animales de estos mismos grupos.

Grupo I control vehículo. Las ratas recibieron dieta CHOW durante las 14 semanas que duró el protocolo y se les administró aceite vegetal vía oral (0.5 mL) durante 14 días previos a finalizar el protocolo.

Grupo II control silimarina. Las ratas recibieron dieta CHOW durante las 14 semanas que duró el protocolo y se les administró el tratamiento de silimarina (200 mg/kg/día) disuelto en aceite vegetal vía oral (0.5 mL) durante 14 días previos a finalizar el protocolo.

Grupo III HFD vehículo. Las ratas recibieron HFD durante las 14 semanas que duró el protocolo y se les administró aceite vegetal vía oral (0.5 mL) durante 14 días previos a finalizar el protocolo.

Grupo IV HFD silimarina. Las ratas recibieron HFD durante las 14 semanas que duró el protocolo y se les administró el tratamiento de silimarina (200 mg/kg/día) disuelto en aceite vegetal vía oral (0.5 mL) durante 14 días previos a finalizar el protocolo.

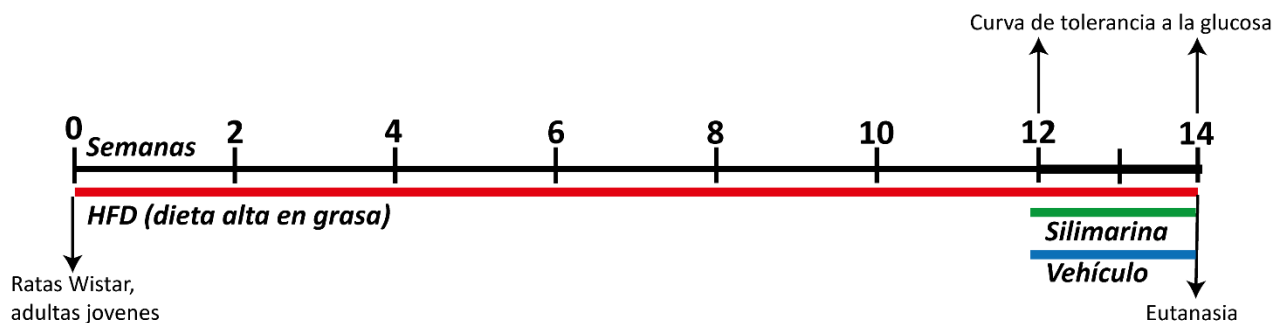


Figura 7 Diseño experimental. Los animales se mantuvieron bajo un régimen alimenticio durante 14 semanas, y a partir de la semana 12 recibieron la silimarina 200 mg/Kg/día o vehículo, por vía oral.

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

La prueba de tolerancia a la glucosa consistió en la administración intraperitoneal de 1 ml de glucosa a una concentración de 2 g/Kg. Las ratas fueron puestas en ayuno durante 12 horas previas a la prueba. La cuantificación de la glucosa en plasma se obtuvo usando el glucómetro (Optimus pro), a partir de muestras de sangre de la vena caudal de los mismos animales a diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60, y 120 min) (Rivera *et al.*, 2013).

Procedimiento conductual

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

Aparatos

En la PRON se utilizó una caja cuadrada de madera (40X40X40 cm) con el piso cubierto de aserrín. Se colocó una video cámara encima de la caja para grabar las sesiones. Los objetos a discriminar fueron un foco y un frasco transparente de vidrio, mismos que se fijaron al piso con velcro para evitar que fueran desplazados por las ratas. Los objetos se colocaron en las esquinas de las cajas a 10 cm de distancia de las paredes. Para evitar señales olfativas los objetos se limpiaron con etanol al 70% y el aserrín de las cajas se removió después de cada ensayo. Los experimentos se realizaron durante la fase de luz a las 9:30 horas.

Procedimiento

En todos los experimentos los animales habitaron en el cuarto experimental para disminuir el estrés durante las pruebas que pudiera afectar la ejecución de la tarea. Los animales tuvieron una fase de habituación de 3 minutos durante 5 días consecutivos en la caja sin objetos.

Después de la fase de habituación se llevó a cabo la fase de adquisición, en la cual se introdujo a la rata a la caja experimental y se le permitió explorar dos objetos idénticos A1 y A2 (dos frascos de vidrio) durante 10 minutos. Después de la fase de adquisición se realizó la prueba de memoria de corto plazo a los 90 minutos y de largo plazo a las 24 horas. En la prueba de memoria a corto plazo se introdujo a la

rata en a la caja mirando hacia la pared opuesta al sitio donde se colocaron el objeto A (frasco de vidrio) y el nuevo objeto B (foco redondo blanco) durante 3 minutos. En la prueba de memoria de largo plazo el objeto novedoso fue C (foco largo blanco).

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso en contexto

Aparatos

En los experimentos de memoria de reconocimiento de objeto novedoso en contexto se utilizaron dos arenas con diferentes características físicas. Una arena cuadrada de madera (40X40X40 cm) y otra circular (40 cm de alto X 40 cm de diámetro) como el segundo contexto (cilindro negro), en ambas arenas el piso fue cubierto de aserrín. Las arenas fueron colocadas en el mismo cuarto con una iluminación controlada. Se colocó una vídeo cámara por encima de las cajas para grabar todas las sesiones. Los objetos a discriminar fueron focos y frascos transparentes de vidrio. Los objetos se fijaron al piso con velcro para evitar que fueran desplazados por las ratas. Los objetos se colocaron en las esquinas traseras de las cajas a 10 cm de distancia de las paredes. Para evitar señales olfativas los objetos se limpiaron con etanol al 70% y el aserrín de las cajas se removió después de cada ensayo. Los experimentos se realizaron durante la fase de luz.

Procedimiento de la prueba

Durante 5 días consecutivos los animales fueron habituados durante 3 minutos a ambos contextos sin objetos (separados por un intervalo de 90 minutos). En la fase de muestra 1, se colocó a la rata en el contexto 1 (caja cuadrada) y se le permitió explorar libremente 2 objetos diferentes durante 10 minutos (frasco de vidrio y foco). A las 24 horas, en la fase de muestra 2 se coloca a la rata en el contexto 2 (cilindro negro) y se le permitió explorar libremente dos objetos idénticos durante 10 minutos (dos frascos de vidrio). A los 90 minutos se realizó la prueba de memoria a corto plazo, donde se reintroduce a la rata en el contexto 2 (cilindro negro) y se le permitió explorar durante 3 minutos los dos objetos presentados en la fase de muestra 1 (frasco de vidrio y foco redondo blanco). En este caso el foco es el objeto novedoso porque es la primera vez que es presentado en el contexto 2 (Balderas *et al.*, 2008). A las 24 horas de la fase de adquisición se realizó la prueba de memoria de largo plazo (**Figura 8**).

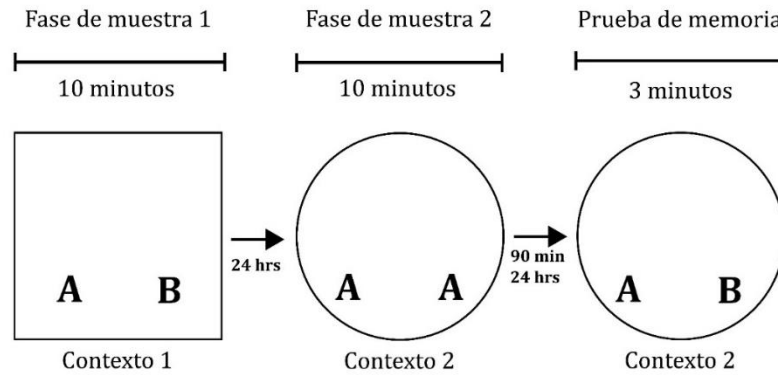


Figura 8 Esquema del procedimiento de la prueba conductual reconocimiento de objeto novedoso en contexto.

Análisis de las pruebas conductuales de objeto novedoso y objeto novedoso en contexto

Se considera como conducta de exploración cuando el animal dirige la nariz en dirección del objeto a una distancia menor a 1 cm y/o que lo toque con la nariz. Se calcula un índice de reconocimiento para los objetos, el cual se define como el tiempo de exploración del objeto nuevo expresado en función del tiempo total dedicado a la exploración de los dos objetos. Un índice de reconocimiento mayor a 0.5 indica que hay preferencia por el objeto novedoso (Ennaceur y Delacour 1988).

$$\text{índice de reconocimiento} = \frac{B}{A + B}$$

Laberinto acuático de Morris (LAM)

El LAM es una prueba conductual utilizada para evaluar aprendizaje y memoria espacial (Morris 1984). La prueba del laberinto acuático se divide en dos etapas, la primera etapa consta de una serie de ensayos donde el animal aprende a través de pistas espaciales dónde se encuentra la plataforma. En esta etapa los animales fueron sometidos a una sesión de entrenamiento diaria de cuatro ensayos durante cinco días consecutivos para encontrar la plataforma que estaba fija y sumergida a 1 cm en uno de los cuatro cuadrantes. Los animales fueron colocados en el tanque y liberados en cuatro distintos puntos del mismo, permitiéndoles nadar libremente 120 s para encontrar la plataforma (15 x 15 cm), si durante este tiempo no encontraban se les guio manualmente a ella. Una vez que los animales llegaron a la plataforma, se les mantuvo en ella durante 20 s y después se colocaron en una caja fuera del tanque aproximadamente 10 min. Todos los ensayos fueron vídeograbados (c170 Logitech Webcam) y analizados posteriormente en el software Solomon coder. En esta tarea se cuantificó la latencia de escape, es decir, el tiempo en que tardan en llegar a la plataforma (Datusalia y Sharma 2014).

La sesión de prueba de retención de la memoria se realizó el día seis. Se retiró la plataforma y los animales se colocaron en el tanque durante 120 s. Posteriormente se midió el tiempo que pasó el animal en el cuadrante donde estaba la plataforma (Datusalia y Sharma 2014).

Obtención y análisis de muestras

En la semana 14 después de las pruebas conductuales y de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal, se obtuvieron muestras de sangre las cuales fueron centrifugadas (1600g por 10 min a 4°C) y el plasma fue almacenado a -70 °C. Después de 24 horas los animales fueron anestesiados y se realizó la eutanasia. Se tomaron muestras del tejido adiposo blanco visceral, y se removió el cerebro, el cual fue diseccionado para obtener la corteza prefrontal y el hipocampo. Las muestras se pesaron y fueron inmediatamente congeladas hasta el momento de realizar los ensayos bioquímicos.

Determinación de marcadores de estrés oxidante

La determinación de marcadores de estrés oxidante se realizó con el apoyo del Dr. José Pedraza Chaverri y del M.C. Omar Noel Medina Campos, del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

Se midió la concentración de proteínas totales en el homogenado mediante el método de Lowry (Lowry et al. 1951). Para la determinación de proteínas se necesitan 20 μL del homogenizado de la muestra, y se le añadieron 340 μL de solución C que se compone de 50 mL de reactivo A (Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N) y 1 mL de reactivo B (CuSO_4 0.5% en tartrato de sodio y potasio 1%). Una vez agregada la solución C, se mezclaron las muestras y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 100 μL de solución follin 1:2 y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se detectó en un lector de placas Biotek a una longitud de onda de 550 nm. La concentración de proteína de cada muestra se determinó con base a una curva estándar de albumina al 0.05%.

Peroxidación lipídica (MDA)

La concentración de MDA se determinó de acuerdo al protocolo de Gérard-Monnier et al. (1998). El sobrenadante de los tejidos homogenizados en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 de los cerebros fueron centrifugados a 3000 g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se incubó en 1-metil-2-fenilindol (15.4 mM) en acetonitrilo: metanol (3:1) a 45°C durante 40 min. Los aductos de MDA se detectaron a 586 nm. La concentración de MDA se determinó usando una curva estándar de tetrametoxipropano.

Estimación de la actividad de la CAT y de la SOD total

La actividad de la CAT fue evaluada de acuerdo al protocolo de Hussein y Najm (2015). El ensayo se basa en la disminución de la absorbancia del H_2O_2 debido a su degradación por la CAT para formar oxígeno molecular y agua. Se incubó la enzima de la muestra en 1.0 mL de sustrato (65 μmol / mL de H_2O_2 en 60 mmol, en un amortiguador de fosfato de sodio/potasio (50 mM), pH 7.4, a 37° C por tres minutos. La reacción fue detenida con molibdato de amonio.

La actividad de la SOD se midió por la capacidad de la enzima por inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantinaoxidasas (XO) (Oberley y Spitz 1984). En el ensayo se preparó una mezcla de reacción (**Tabla 2**), sin XO que es la enzima que inicia la reacción. Para el ensayo se colocaron en un tubo de ensayo 1.66 mL de mezcla de reacción, 330 μL de amortiguador y 33 μL de XO (168 U/L). La reacción se incubó 15 min a 27°C. Después

se agregaron 660 μL de CuCl_2 para detener la reacción. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm durante 3 min, cada min, en un espectrofluorómetro.

Tabla 2 Mezcla de la reacción para determinar la actividad de SOD en el tejido cerebral

	Concentración final
Xantina	0.122 mM
EDTA	0.122 mM
NBT	30.6 μM
Albúmina	0.006%
Na_2CO_3	49 mM

Estimación de la actividad de la glutatión reductasa, glutatión peroxidasa GPx y glutatión s transferasa

La actividad de la glutatión reductasa requiere NADPH, esta cataliza la conversión de GSSG a GSH. El método de cuantificación de la actividad fue con base en el método descrito por Carlberg y Mannervik el cual se basa en medir la desaparición de NADPH a 340 nm de una mezcla de reacción que contiene GSSG, EDTA, NADPH (Carlberg y Mannervik 1975). La mezcla de reacción contiene amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.6, EDTA 0.5 mM, GSSG 1.25 mM y NADPH 0.1 mM. La reacción se inicia agregando 50 μL de homogenado del tejido cerebral total diluido 1:5 con amortiguador de fosfatos 100 mM. La mezcla fue centrifugada a $20,937 \times g / 4^\circ\text{C}/1 \text{ h}$. Se obtuvo el sobrenadante, se agitó en vórtex y se vació por decantación a la celda (placas de ELISA) para iniciar las lecturas. Se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 3 minutos utilizando un programa de cinética.

La actividad de la GPx se midió de manera indirecta por la reacción acoplada con la GR, la cual se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NADPH. La GPx cuando reduce los hidroperóxidos consume GSG, el cual es regenerado por la GR a partir de GSSG, proceso que consume NADPH. El ensayo se realizó basado en el protocolo con modificaciones de Lawrence y Burk (Lawrence y Burk 1976). El ensayo inicia al colocar en un tubo de vidrio 400 μL de la mezcla de reacción (**Tabla 3**) y 50 μL de la muestra de tejido cerebral. Después de 5 minutos de incubación, se añadieron 50 μL de H_2O_2

(1.25 mM). La mezcla se agitó en el vórtex y se vació por decantación en la celda (placa de ELISA). Se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 3 minutos en el espectrofotómetro.

Tabla 3 Mezcla de reacción para determinar la actividad de GPx en el tejido cerebral

	Concentración final
EDTA	1 mM
Azida de sodio	1 mM
NADPH	0.2 mM
Glutati3n reducido	1 mM
Glutati3n reductasa	1 U/ mL
Amortiguador de fosfatos	50 mM

La glutati3n S-transferasa cataliza la conjugaci3n del GSH end3geno a una variedad de compuestos electrofílicos, protegiendo las macromol3culas biol3gicas. La actividad de esta enzima fue evaluada siguiendo el m3todo de Habig (Habig, Pabst, y Jakoby 1974). La enzima fue determinada utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) y glutati3n reducido (GSH), como sustratos que forman el conjugado 2,4-dinitrofenil-S-conjugado que absorbe a 340 nm.

Análisis estadístico

El análisis de todos los datos se llevó a cabo usando el programa estadístico GraphPad Prism 5.01. Todos los datos se muestran como el promedio \pm el error estándar de la media (ESM). Se realizó la prueba de Pearson-omnibus para confirmar que los datos tengan una distribuci3n normal, la prueba de T de student nivel de confianza del 95%. Se realizó un ANOVA de 2 vías seguido de una prueba de comparaci3n múltiple de Tukey. El área bajo la curva (ABC) fue calculada por la suma de trapezoides entre los diferentes puntos de los niveles de glucosa en sangre.

7. Resultados

A continuación, se presentan los resultados divididos en tres secciones. En la primera sección, se presentan los resultados relacionados con la inducción del modelo de obesidad en las ratas Wistar, la segunda sección, se muestran el desempeño en las pruebas conductuales, donde se evaluó el aprendizaje y la memoria. En la tercera, se muestran los resultados del estado de EO en el SNC a través de medir la actividad de diversas enzimas antioxidantes, así como la lipoperoxidación, tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo.

Alteraciones metabólicas asociadas a la acumulación de tejido adiposo

La primera aproximación en el presente estudio fue evaluar el incremento del peso corporal como consecuencia de la administración de la HFD, conocer las posibles alteraciones en el metabolismo de la glucosa y el efecto del tratamiento de silimarina en estos parámetros.

Efecto de la dieta alta en grasa sobre el peso corporal

Los animales iniciaron con pesos de 300 g. En la semana cuatro de la dieta los grupos control tenía un promedio de peso de 376 ± 3.76 g, mientras que los grupos HFD de 405 ± 4.85 g. Desde la semana cuatro hasta la última semana de dieta, los grupos ya eran significativamente diferentes. En la semana 12 previo al tratamiento con silimarina, los grupos control tenía un promedio de peso de 449 ± 4.75 g, mientras que los grupos HFD de 519 ± 6.57 g, es decir, el peso corporal de los animales alimentados con la dieta alta en grasa era 15% mayor comparado con los controles (**Figura 9**).

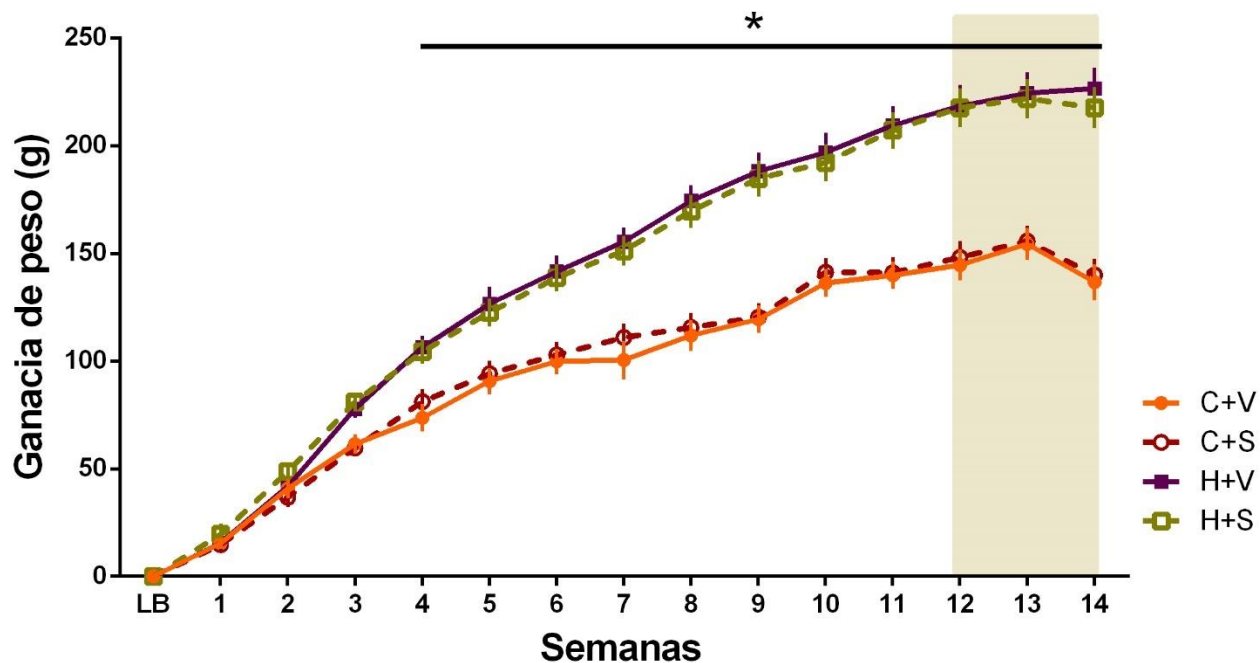


Figura 9 Ganancia de peso corporal. Seguimiento del peso corporal en animales controles vehículo (C+V, línea naranja continua n= 30), controles silimarina (C+S, línea vino punteada n= 27) y en animales alimentados con una dieta alta en grasa vehículo (H+V, línea morada continua n= 30) y dieta alta en grasa con silimarina (H+S, línea verde punteada n= 30). El * indica una diferencia significativa entre grupos según la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.5$). Los datos se muestran como promedio \pm error estándar.

El tratamiento de silimarina no causó una disminución en el peso corporal

Uno de los objetivos planteados fue conocer si el tratamiento con silimarina tendría un efecto en el peso corporal y particularmente si disminuía el peso de los sujetos alimentados con la HFD. Después de los 14 días de tratamiento con la silimarina, ésta no produjo un cambio significativo en el peso corporal de los animales (**Tabla 4**). Cabe mencionar que en el caso del grupo con trol vehículo, el aceite vegetal tampoco tuvo efectos.

Tabla 4 La administración de silimarina no modifica el peso corporal.

	C+V	C+S	H+V	H+S
semana 12	450 ± 6.99	444 ± 6.39	522 ± 9.84*	515 ± 8.79*
semana 14	440 ± 6.98	438 ± 5.62	527 ± 9.80*	519 ± 9.17*

Promedios de los pesos corporales de los cuatro grupos experimentales en la semana 12 (previo al tratamiento con silimarina) y en la semana 14 (después del tratamiento con silimarina). *Promedio ± Error estándar, ANOVA de una vía *P<0.05*

Efecto de la dieta alta en grasa sobre el metabolismo de glucosa

En el modelo experimental que utilizamos, se alimentaron a los animales con una HFD (54% de lípidos) durante 14 semanas. En la semana 12 antes de iniciar con el tratamiento de silimarina, se evaluó el metabolismo de glucosa, en los grupos experimentales control (C) y dieta alta en grasa (HFD), con la finalidad de conocer si la HFD alteró negativamente el metabolismo de glucosa. Para tal objetivo, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

La concentración de glucosa en sangre en el tiempo cero, previo a la administración de glucosa, fue similar en ambos grupos. En los puntos temporales 15, 30, 60 y 120 min los animales que fueron alimentados con la HFD presentan diferencias estadísticamente significativas con una mayor concentración de glucosa (**Figura 10 a**).

En resumen, los grupos experimentales que recibieron la HFD mantuvieron concentraciones de glucosa más elevadas que los animales que recibieron la dieta control. Para evidenciar este resultado, se calculó el área bajo la curva de los grupos experimentales. Los grupos alimentados con la HFD tuvieron una mayor área bajo la curva (unidades arbitrarias, **Figura 10 b**).

En la **Tabla 5**, se muestran los valores de concentración de glucosa (mg/dl) de los dos grupos experimentales en los diferentes puntos temporales previo al tratamiento de silimarina.

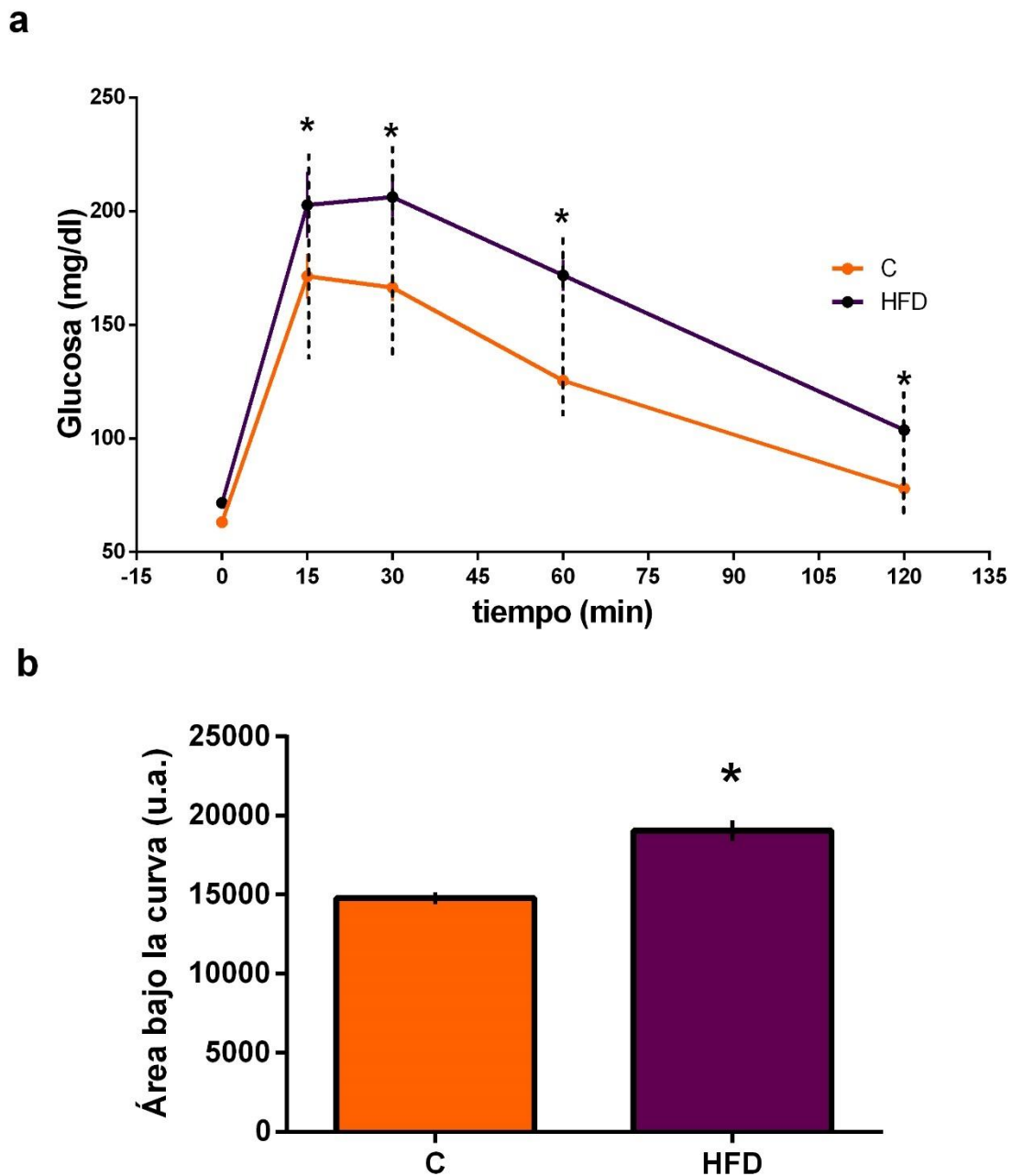


Figura 10 Efecto de la HFD sobre el metabolismo de captura de glucosa. (a) Curva de tolerancia a la glucosa controles (C, línea naranja continua n= 24), y en los animales alimentados con una HFD (H, línea morada continua n= 22). El * indica una diferencia significativa entre grupos según la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.5$). (b) Gráfico del área bajo la curva, los valores promedio en unidades arbitrarias del grupo control $14\ 773 \pm 380$ (C, barra naranja n= 24), y en animales HFD $19\ 061 \pm 655$ (HFD, barra morada n= 22). El * indica una diferencia significativa entre grupos según la prueba de t de student. En ambos gráficos los resultados son representados como promedio \pm error estándar.

Tabla 5 Valores de las concentraciones de glucosa en sangre (mg/dl) previo al tratamiento con silimarina.

	Tiempo min)	C	HFD
Semana 12	0	63.20 ± 1.01	71.60 ± 2.15
	15	102 ± 9.85	203 ± 14.60*
	30	166 ± 5.92	206 ± 8.53*
	60	125 ± 3.94	172 ± 6.84*
	120	78.80 ± 1.29	104 ± 3.31*

*Promedio ± Error estándar, ANOVA de dos vías *P<0.05 comparado con el grupo C*

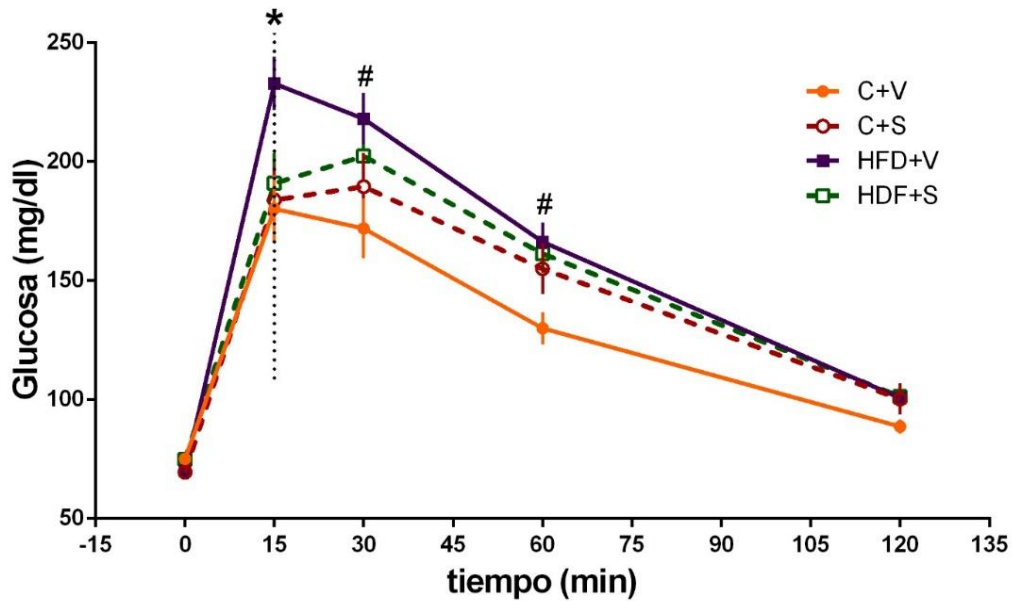
La silimarina disminuye los niveles de glucosa en el grupo de animales alimentados con dieta alta en grasa

Dado que la HFD altera el metabolismo de glucosa al incrementar la concentración de esta en sangre, la siguiente pregunta a contestar fue si el tratamiento de silimarina puede disminuir la concentración de glucosa y mejorar el metabolismo de captación alterado en los animales con HFD. Después de 14 días de tratamiento, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

Al tiempo cero previo al estímulo con la glucosa intraperitoneal los cuatro grupos experimentales no demostraron diferencias significativas. Interesantemente al minuto 15, el grupo experimental HFD+V tuvo el valor más alto de concentración de glucosa (233 ± 11.20 mg/dl), dicho promedio fue estadísticamente significativo respecto a los tres grupos restantes incluyendo al grupo HFD+S (**Figura 11a**). Para los puntos temporales de 30 y 60 minuto, la diferencia estadísticamente significativa fue entre el grupo HFD+V con respecto al C+V, es decir el grupo HFD+S no fue diferente respecto a los grupos alimentados con dieta control, sin embargo, el HFD+S no fue estadísticamente diferente respecto al HFD+V (**Figura 11a**), eso significa que el tratamiento con silimarina disminuye los niveles de glucosa en sangre. En el último punto temporal correspondiente al minuto 120 no hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos.

Se analizó el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en los cuatro grupos, sin embargo, no mostraron diferencias significativas. Los resultados fueron C+V ($15\ 455 \pm 1\ 040$), C+S ($17\ 287 \pm 1\ 372$) y en animales alimentados con una HFD+V ($18\ 627 \pm 758$) y HFD+S ($18\ 849 \pm 872$), (promedio \pm error estándar en unidades arbitrarias) (**Figura 11b**).

En la **Tabla 6**, se muestran los valores de concentración de glucosa (mg/dl) de los cuatro grupos experimentales en los diferentes puntos temporales después del tratamiento con silimarina.

a

Curva de tolerancia a la glucosa después del tratamiento de silimarina

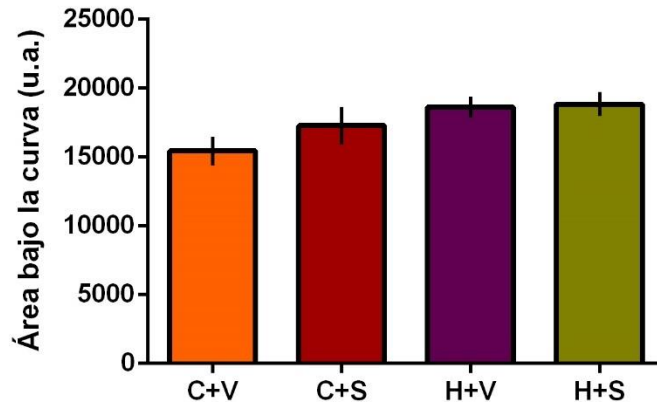
b

Figura 11 Efecto de la silimarina sobre el metabolismo de captura de glucosa en animales alimentados con una dieta alta en grasa. (a) Curva de tolerancia a la glucosa, controles vehículo (C+V, línea naranja continua n= 10), controles silimarina (C+S, línea vino punteada n= 9) y en animales alimentados con una dieta alta en grasa vehículo (H+V, línea morada continua n= 13) y dieta alta en grasa con silimarina (H+S, línea verde punteada n= 14). El * indica una diferencia significativa entre el grupo HFD+V con respecto a los otros tres grupos, El # indica una diferencia significativa entre el grupo HFD+V con respecto C+V según la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.5$) Los resultados son representados como promedio \pm error estándar. (b) Gráfico del área bajo la curva, los valores promedio en unidades arbitrarias.

Tabla 6 Valores de las concentraciones de glucosa en sangre (mg/dl) después del tratamiento con silimarina.

	Tiempo min)	C+V	C+S	H+V	H+S
Semana	0	75.10 ± 1.74	69.60 ± 2.43	70.10 ± 1.90	74.90 ± 2.50
14	15	180 ± 14.10	184 ± 14.50	233 ± 11.20*	191 ± 12.80
	30	172 ± 12.60	190 ± 14.10	218 ± 10.80#	202 ± 9.26
	60	130 ± 6.81	155 ± 10.70	166 ± 8.11#	161 ± 8.14
	120	88.70 ± 2.96	100 ± 6.63	101 ± 3.13	101 ± 2.61

Promedio ± Error estándar, ANOVA de dos vías *P<0.05 comparado con el grupo C+V, C+S y HFD+S, # P<0.05 comparado con el grupo C+V.

El tratamiento de la silimarina no disminuyó el porcentaje del tejido adiposo blanco retroperitoneal en los animales alimentados con dieta alta en grasa.

Para confirmar que la HFD tiene efecto en el aumento del porcentaje de tejido adiposo blanco retroperitoneal, al finalizar el tratamiento con silimarina se realizó la eutanasia de los animales, se extrajo el tejido adiposo. El tejido se pesó y se normalizó con respecto al peso total del animal. Los grupos de ratas que fueron alimentados con HFD mostraron mayor porcentaje de tejido adiposo blanco retroperitoneal (grupo HFD vehículo 3.47 ± 0.24 % y HFD silimarina 3.36 ± 0.16 %) con respecto a aquellos que fueron alimentados con dieta estándar (grupo control vehículo fue de 1.45 ± 0.11 %, y el grupo control silimarina fue de 1.23 ± 0.08 %). El tratamiento con silimarina no tuvo un efecto en la disminución de tejido adiposo entre los animales alimentados con HFD (**Figura 12**).

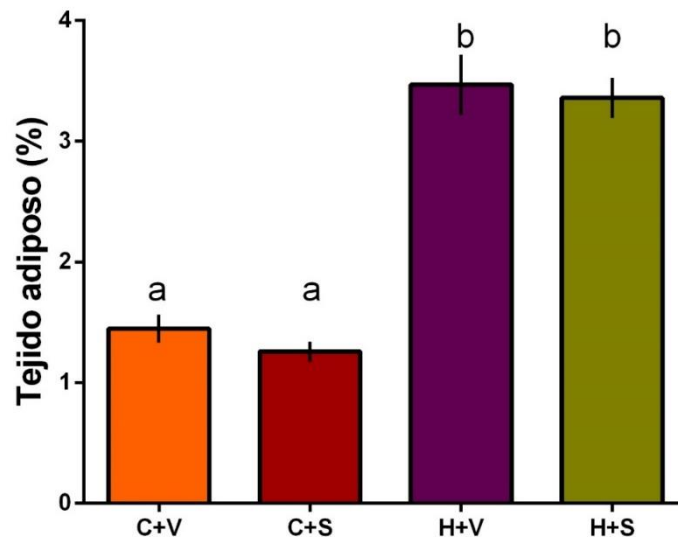


Figura 12 Tejido adiposo blanco retroperitoneal. Control vehículo (C+V, barra naranja n= 29), control silimarina (C+S, barra vino n= 24) y en animales alimentados con HFD vehículo (H+V, barra morada n= 28) y dieta alta en grasa con silimarina (H+S, barra verde n= 27). La literal a y b indica una diferencia significativa entre grupos según la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.5$) Los resultados son representados como promedio \pm error estándar.

Efecto de la silimarina en las pruebas conductuales: reconocimiento de objeto novedoso, reconocimiento de objeto novedoso en contexto y laberinto acuático de Morris

Reconocimiento de objeto novedoso

Para evaluar el efecto de la HFD y posible efecto benéfico de la silimarina sobre las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria) en las ratas; la primera aproximación fue realizar la prueba de memoria de reconocimiento de objeto novedoso a corto y largo plazo en los cuatro grupos experimentales.

Para el caso de la prueba de memoria de corto plazo, los grupos control vehículo, control silimarina y HFD silimarina presentaron índices de reconocimiento mayores a 0.5. Esto significa que los animales fueron capaces de discriminar el objeto novedoso del objeto familiar. Sin embargo, el grupo HFD vehículo presentó un índice de 0.45 ± 0.08 , es decir, las ratas de este grupo no recordaron haber experimentado el objeto familiar previamente. Mientras que el grupo HFD que recibió el tratamiento de silimarina si lo recuerda, estas ratas presentaron un índice promedio de 0.75 ± 0.03 (**Figura 13 a, Tabla 5**).

Para el caso de la prueba de memoria de reconocimiento de objeto novedoso a largo plazo, los cuatro grupos experimentales mostraron índices mayores a 0.5, aunque los grupos HFD tanto los que recibieron el vehículo como los que recibieron el tratamiento de silimarina presentaron índices menores comparados con el grupo control vehículo (**Figura 13 b, Tabla 5**).

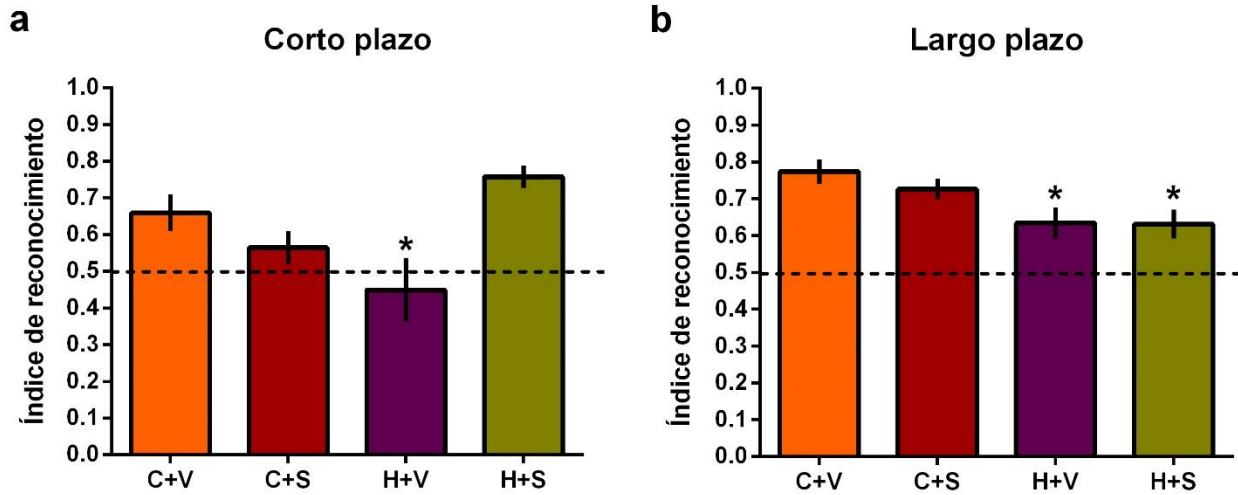


Figura 13 Gráficos de los índices de reconocimiento de objeto novedoso. (a) Memoria corto plazo (90 min.) y (b) Memoria largo plazo (24 hrs.) Controles vehículo (C+V, barra naranja n= 8), controles silimarina (C+S, barra vino n= 8) y en animales alimentados con HFD vehículo (H+V, barra morada n= 8) y HFD con silimarina (H+S, barra verde n= 8). Los resultados son representados como promedio \pm error estándar. Los datos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple de una vía y se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. *Para el caso de la memoria a corto plazo el * indica una diferencia significativa comparado con el grupo H+S ($p < 0.05$). Para el caso de la memoria a largo plazo el * indica una diferencia significativa comparado con el grupo C+V ($p < 0.05$).*

Tabla 7 Índices de reconocimiento del objeto novedoso para evaluar memoria de corto y largo plazo.

	C+V	C+S	H+V	H+S
Memoria corto plazo	0.66 \pm 0.05	0.56 \pm 0.04	0.45 \pm 0.08*	0.75 \pm 0.03
Memoria largo plazo	0.78 \pm 0.03	0.73 \pm 0.02	0.63 \pm 0.04*	0.63 \pm 0.03*

Los resultados son representados como *promedio \pm error estándar*. *Para el caso de la memoria a corto plazo el * indica una diferencia significativa comparado con el grupo H+S ($p < 0.05$). Para el caso de la memoria a largo plazo el * indica una diferencia significativa comparado con el grupo C+V ($p < 0.05$).*

Reconocimiento de objeto novedoso en contexto

De acuerdo a la literatura, sabemos que diferentes estructuras del lóbulo medio temporal participan en procesos de aprendizaje y de memoria. La investigación de Balderas et al. (2008) nos permitió conocer que particularmente el hipocampo participa en la consolidación de la memoria a largo plazo de

reconocimiento de objeto novedoso en contexto. En nuestros resultados, no encontramos diferencias significativas en esta prueba después de haber alimentado a las ratas con HFD; ni a corto ni a largo plazo. En todos los casos presentaron un índice de reconocimiento mayor a 0.5. Tampoco se encontraron diferencias en los animales tratados con silimarina. (Figura 14, Tabla 5).

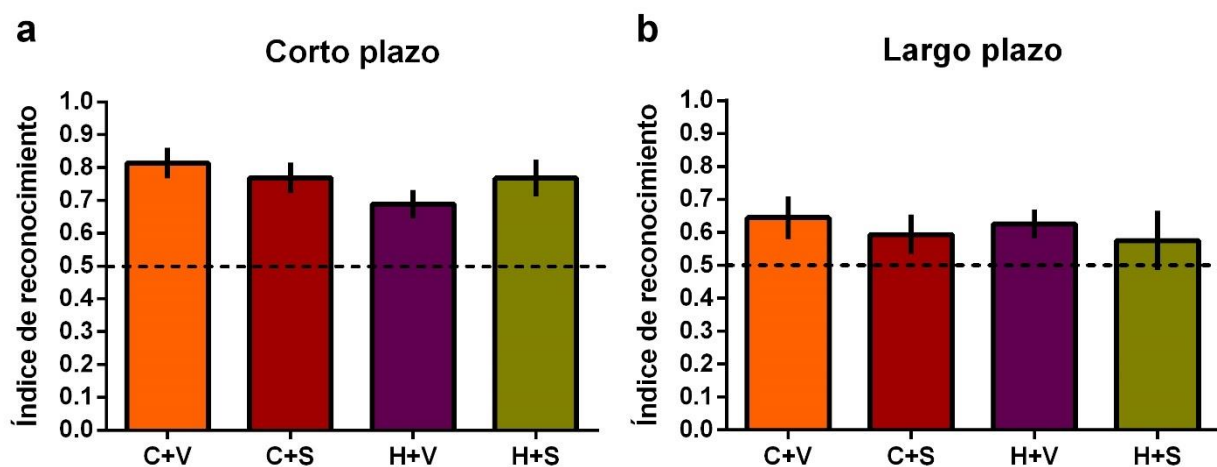


Figura 14 Gráficos de los índices de reconocimiento de objeto novedoso en contexto. (a) Memoria corto plazo (90 min.) y (b) Memoria largo plazo (24 hrs.) Controles vehículo (C+V, barra naranja n= 7), controles silimarina (C+S, barra vino n= 7) y en animales alimentados con HFD vehículo (H+V, barra morada n= 7) y HFD con silimarina (H+S, barra verde n= 7). No se mostraron diferencias significativas entre los grupos. Los resultados son representados como promedio \pm error estándar. Los datos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple de una vía y se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Tabla 8 Índices de reconocimiento del objeto novedoso en contexto para evaluar memoria de corto y largo plazo.

	C+V	C+S	H+V	H+S
Memoria corto plazo	0.74 \pm 0.08	0.79 \pm 0.04	0.68 \pm 0.04	0.76 \pm 0.05
Memoria largo plazo	0.64 \pm 0.06	0.59 \pm 0.05	0.62 \pm 0.04	0.57 \pm 0.08

Los resultados son representados como *promedio \pm error estándar*.

Laberinto acuático de Morris

Para evaluar el posible daño de la HFD y el efecto de la silimarina sobre el desempeño cognitivo se realizó la prueba de laberinto acuático de Morris. En la curva de aprendizaje que se realizó durante cinco días consecutivos los valores de latencia de escape fueron diferentes el primer día, siendo diferente el grupo C+V del grupo HFD+S (**Figura 15 a, Tabla 9**). En el segundo día de la curva de aprendizaje los cuatro grupos disminuyeron en más del 50% el tiempo de latencia de escape, sugiriendo que los cuatro grupos experimentales recordaban en que cuadrante estaba la plataforma. Para los días tres, cuatro y cinco los tiempos de latencia de escape continuaron disminuyendo sin diferencias significativas entre los grupos. En el día de la prueba cuando la plataforma fue retirada del laberinto y se midió el tiempo de nado en el cuadrante, los cuatro grupos mostraron valores que no fueron diferentemente significativos entre ellos, los cuatro grupos emplearon valores de más de 30 segundos (**Figura 15, Tabla 10**).

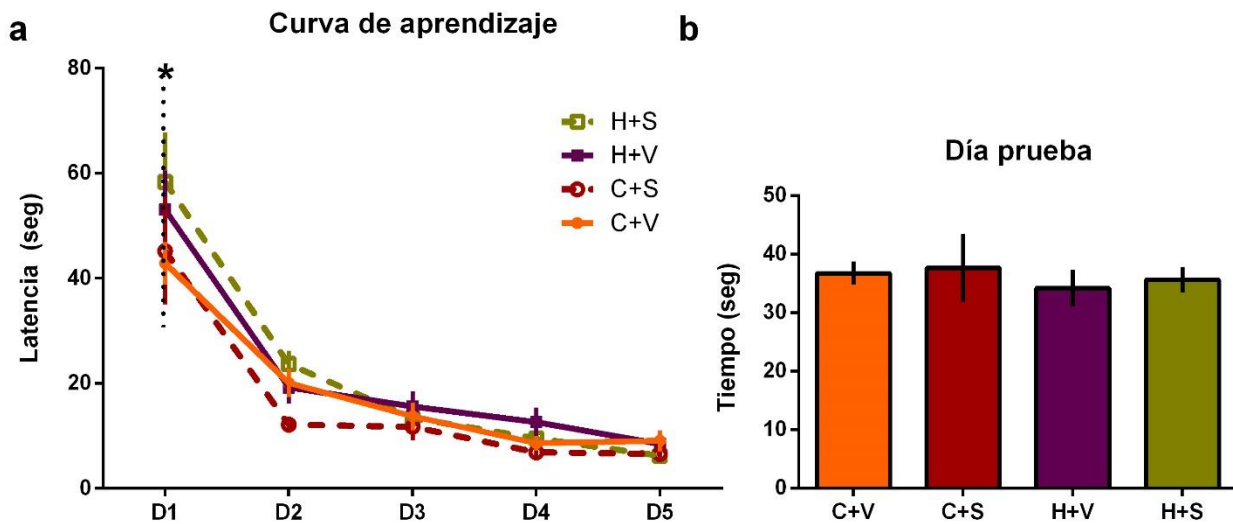


Figura 15 Efecto de la dieta alta en grasa y de la silimarina sobre la prueba de laberinto acuático de Morris. (a) Tiempo de latencia de escape (segundos) en la curva de aprendizaje controles vehículo (C+V, línea naranja continua $n=9$), controles silimarina (C+S, línea vino punteada $n=5$) y en animales alimentados con HFD vehículo (H+V, línea morada continua $n=8$) y HFD con silimarina (H+S, línea verde punteada $n=7$). (b) Tiempo empleado en el cuadrante donde estaba la plataforma. Los resultados son representados como promedio \pm error estándar. El * indica una diferencia significativa entre C+V vs H+S ($p < 0.05$). Los datos fueron sometidos al análisis de varianza múltiple de una vía y se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Tabla 9 Valores del tiempo en segundo de latencia de escape en la curva de aprendizaje de la prueba de laberinto acuático de Morris.

	C+V	C+S	H+V	H+S
Día 1	42.80 ± 4.05	45.20 ± 10.10	53.10 ± 7.44	58.4 ± 9.4*
Día 2	20.10 ± 2.68	12.10 ± 1.59	19.20 ± 3.11	23.7 ± 2.52
Día 3	13.70 ± 2.64	11.70 ± 2.59	15.60 ± 2.88	13.4 ± 1.17
Día 4	8.62 ± 1.38	6.88 ± 1.43	12.56 ± 2.78	9.55 ± 1.58
Día 5	9.06 ± 2.03	6.54 ± 1.22	7.90 ± 1.52	6.23 ± 0.61

Los resultados son representados como *promedio ± error estándar*, ANOVA de dos vías * $P < 0.05$ comparado con el grupo C+V

Tabla 10 Valores del tiempo en segundos del tiempo de nado el día de la prueba en el cuadrante donde estaba la plataforma del laberinto acuático de Morris.

Grupo experimental	C+V	C+S	H+V	H+S
tiempo	36.7 ± 1.98	37.6 ± 5.78	36.0 ± 3.33	34.0 ± 2.52

Los resultados son representados como *promedio ± error estándar*.

Efecto de la dieta y del tratamiento de silimarina sobre el estrés oxidante en la corteza prefrontal y el hipocampo

Efecto de la silimarina sobre la concentración de malondialdehído (MDA) en la corteza prefrontal y en el hipocampo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa

Dado que se conoce que la HFD produce un estado de EO en la periferia, la siguiente pregunta fue si en el cerebro, particularmente en la corteza prefrontal y el hipocampo, también se estaba desarrollando una condición de EO a las 14 semanas de HFD y si la silimarina después de 14 días de tratamiento tiene una contribución positiva. Una manera de contestar esta pregunta es a través de la medición de la peroxidación lipídica que es causada por las ROS, para dicho propósito se cuantificó la concentración de malondialdehído (MDA), un metabolito secundario de la peroxidación.

Los resultados fueron normalizados respecto al C+V que es representado como el 100%, para el caso de la corteza prefrontal tanto los grupos C+S, HFD+V y HFD+S los valores de MDA fueron 127 ± 15.5 , 130 ± 11.2 y 127 ± 17 respectivamente (**Figura 16**). Para el caso de la región del hipocampo los grupos C+S, HFD+V y HFD+S los valores de MDA fueron 67.3 ± 14.1 , 79.5 ± 7.5 y 88.6 ± 10.2 respectivamente. No se encontraron diferencias dadas por el tratamiento de silimarina. (**Figura 16**).

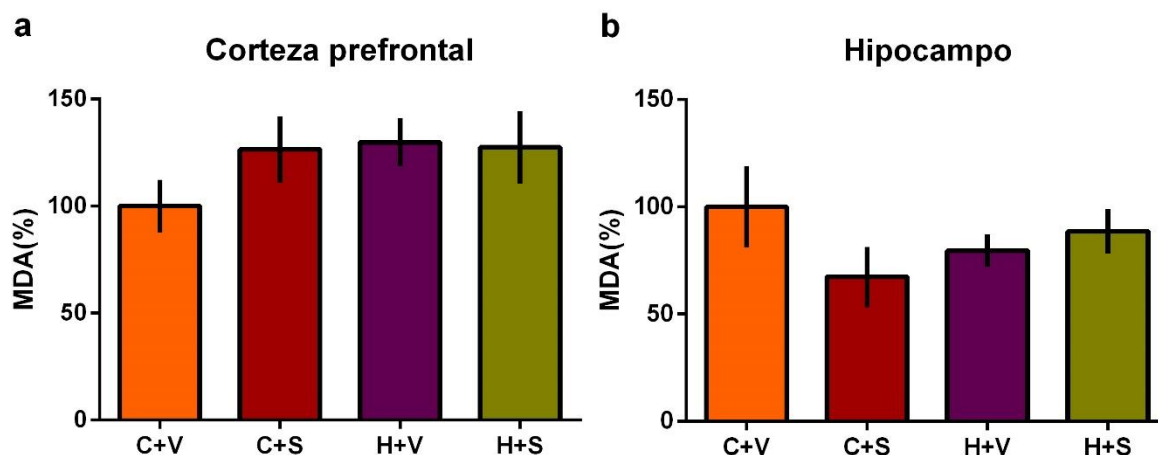


Figura 16 Efecto de la silimarina sobre la concentración de malondialdehído (MDA) en la corteza prefrontal y el hipocampo de ratas alimentadas con HFD. Controles vehículo (C+V, barra naranja n= 8), controles silimarina (C+S, barra vino n= 5) y en animales alimentados con HFD vehículo (H+V, barra morada n= 8) y HFD con silimarina (H+S, barra verde n= 8). Los resultados son representados como promedio \pm error estándar. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza múltiple de una vía y se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Efecto de la silimarina sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa y catalasa en el SNC de animales alimentados con una dieta alta en grasa

En este proyecto, se evaluó la actividad de la enzima SOD, esta metaloenzima cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ para producir H_2O_2 y O_2 , tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo, no se encontraron diferencias en la actividad de esta entre los grupos experimentales. Los resultados fueron normalizados respecto al C+V que es representado como el 100%. Para el caso de la corteza prefrontal tanto los grupos C+V, C+S, HFD+V y HFD+S los valores de la actividad de la SOD fueron 100 ± 11.7 , 101 ± 13.3 , 106 ± 9.61 y 106 ± 6.49 mientras que en el hipocampo los valores fueron 100 ± 12.1 , 90.9 ± 11.5 , 115 ± 13.4 y 104 ± 19.2 , respectivamente, (**Figura 17 a y b**).

Se evaluó la actividad de la enzima CAT, la cual cataliza la reducción del H_2O_2 a O_2 y agua. Los resultados fueron normalizados respecto al C+V que es representado como el 100%. Para el caso de la corteza prefrontal los valores de la actividad para los grupos C+V, C+S, HFD+V y HFD+S fueron 100 ± 8.47 , 106 ± 10.2 , 108 ± 7.93 y 141 ± 13.7 . La actividad en la corteza prefrontal fue significativamente mayor en el grupo H+S comparado con el H+V. El análisis de comparación múltiple no mostró diferencias entre H+S

vs H+V. La actividad de la CAT en el hipocampo fue similar en los grupos C+V, C+S, HFD+V y HFD+S sin diferencias significativas estos fueron 100 ± 12.1 , 90.9 ± 11.5 , 115 ± 13.4 y 104 ± 19.2 (Figura 17 c y d).

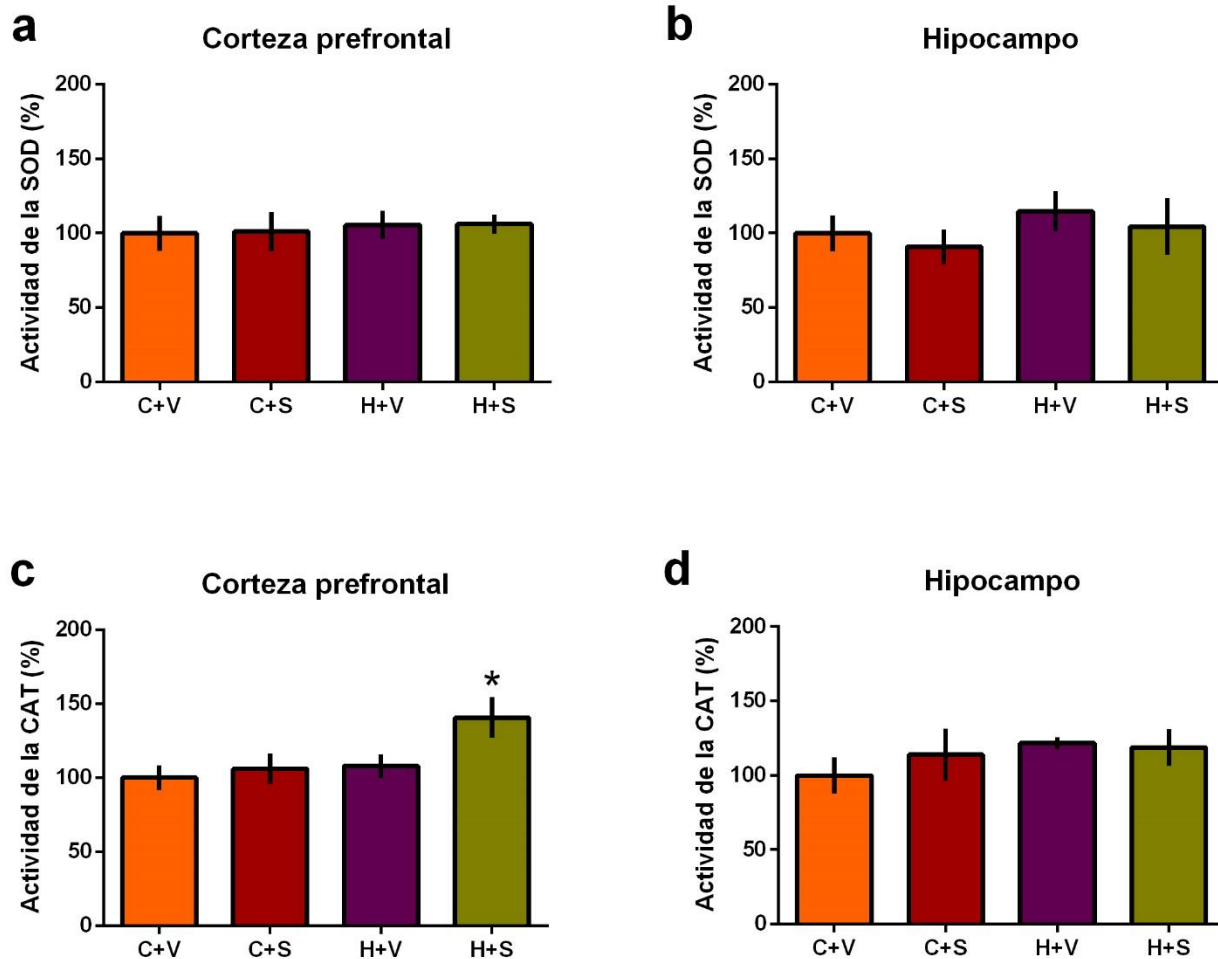


Figura 17 Efecto de la silimarina sobre la actividad de las enzimas la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en la corteza prefrontal y en el hipocampo de ratas alimentadas con HFD. Controles vehículo (C+V, barra naranja n= 8), controles silimarina (C+S, barra vino n= 7) y en animales alimentados con HFD vehículo (H+V, barra morada n= 7) y HFD con silimarina (H+S, barra verde n= 5). Los resultados son representados como promedio \pm error estándar. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza múltiple de una vía y se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa

Los resultados fueron normalizados respecto al control vehículo que es representado como el 100%. La actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) no fue significativamente diferente entre los cuatro grupos experimentales: C+V, C+S, HFD+V y HFD+S ni en la corteza prefrontal (100 ± 10.5 , 104 ± 10.9 , 102 ± 6.45 y 105 ± 11.4 , respectivamente), ni en el hipocampo (100 ± 16.5 , 133 ± 14.8 , 133 ± 7.05 y 133 ± 12.8 , respectivamente **Figura 18 a y b**). Del mismo modo, no se observaron cambios entre los cuatro grupos de la actividad de la enzima GR para los cuatro grupos silimarina ni en la corteza prefrontal (100 ± 10.6 , 126 ± 17.1 , 112 ± 6.76 y 118 ± 10.8 , respectivamente), ni en el hipocampo (100 ± 6.59 , 111 ± 12.6 , 121 ± 9.3 y 105 ± 6.49 , respectivamente (**Figura 18** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**c y d**)).

En cuanto a la actividad de la enzima glutatión s-transferasa, no se observaron diferencias entre los cuatro grupos experimentales: C+V, C+S, HFD+V y HFD+S para la región de la corteza prefrontal (100 ± 11.3 , 104 ± 16.8 , 104 ± 6.43 y 94 ± 11.9 , respectivamente). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima en la región del hipocampo con un 30% de mayor actividad en los grupos alimentados con dieta alta en grasa: HFD+V y HFD+S comparado con el grupo C+V (**Figura 18 f**).

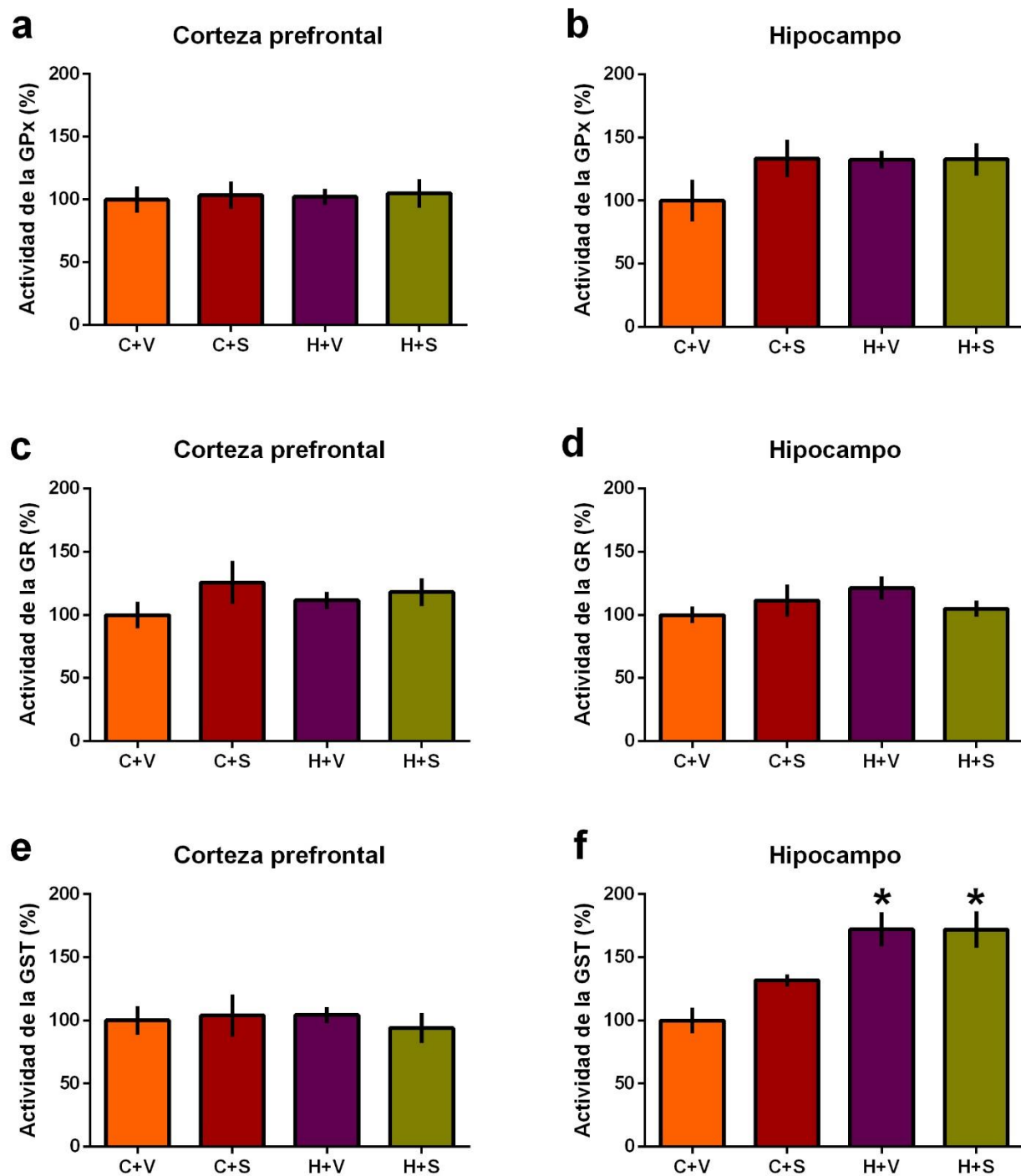


Figura 18 Actividad del sistema antioxidante de glutación: glutación reductasa (GR), glutación peroxidasa (GPx) y glutación S-transferasa (GST) en la corteza prefrontal y el hipocampo. Controles vehículo (C+V, barra naranja n= 7), controles silimarina (C+S, barra vino n= 5) y en animales alimentados con HFD vehículo (H+V, barra morada n= 7) y HFD con silimarina (H+S, barra verde n= 7). Los resultados son representados como promedio \pm error estándar. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza múltiple de una vía y se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

8. Discusión general

La ingesta de dietas altas en calorías y en grasas se está volviendo cada vez más común en nuestra sociedad. Esto representa un factor de riesgo para el desarrollo de sobrepeso, obesidad, síndrome metabólico y de otras enfermedades crónicas, incluyendo las neurodegenerativas como el Alzheimer (Haddadi, Shahidi, y Eyvari-Brooshghalan 2020; Köbe *et al.*, 2017; Y. Liu *et al.*, 2014). Ahora es bien reconocido que la nutrición es un factor que influye en la estructura cerebral, en la conectividad funcional y la cognición (Köbe *et al.*, 2017).

Componentes bioactivos de diversas plantas como: berberina (*Coptis chinensis*), curcumina (*Curcuma longa*), ginsenoside Rg1 (*Panax notogiseng*), puerarin (*Pueraria lobata*), entre otras plantas tienen efectos neurobiológicos benéficos en la clínica (M. H. Kim, Kim, y Yang 2014). Así también, la silimarina es el extracto de flavonoides y flavolignanós que se encuentra en las semillas de la planta cardo mariano. Hay una creciente cantidad de reportes de la silimarina y de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Pérez-H *et al.*, 2014; P. Liu *et al.*, 2020). En estudios previos, se han reportado sus efectos neuroprotectores en modelos de daño neuronal, como en modelos de la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, isquemia cerebral, etc. (Pérez-H *et al.* 2014; Haddadi, Shahidi, y Eyvari-Brooshghalan 2020). En este proyecto evaluamos el impacto de una HFD en el metabolismo de la glucosa, en las funciones cognitivas y en el balance REDOX del cerebro, así como el efecto del tratamiento subcrónico de silimarina.

El primer paso fue establecer el modelo HFD. En esta investigación utilizamos una HFD con un porcentaje de grasa del 54% durante 14 semanas, con base en previas investigaciones. Por ejemplo, el trabajo de Woo *et al.* (2013) en el que utilizaron un modelo de HFD del 40% de grasa durante 13 semanas, en ratas Sprague Dawley, y en la cual observaron daño cognitivo en la prueba de laberinto acuático y disminución de los marcadores BDNF y NGF en el hipocampo. Cuando los tiempo de exposición a la HFD son cortos como en el trabajo de Beilharz, Maniam, y Morris (2016) en el que utilizan una HFD (40% de grasa) durante 2 semanas, aun no se observan cambios en la expresión de genes considerados marcadores de inflamación como TNF- α e IL-1 β ni en el tejido adiposo blanco, hipocampo, corteza perirrinal, ni en el hipotálamo. Es por estos, que se eligió un periodo de 12 semanas para primero establecer el modelo de obesidad y de daño cognitivo.

La dosis de silimarina fue seleccionada con base en investigaciones previas, incluyendo nuestro laboratorio, donde se ha reportado y se evalúan los efectos benéficos de la silimarina en diversos modelos de daño en la periferia y en el SNC. Por ejemplo, el trabajo de Hirayama *et al.* (2016) en un modelo de isquemia cerebral en ratas, los investigadores evaluaron el efecto neuroprotector de la silimarina a una dosis de 200 mg/kg, antes y después de la isquemia. Realizaron una tinción de fluorojade en la región del hipocampo para evaluar la neurodegeneración. En el análisis encontraron que disminuyó el número de neuronas teñidas, sugiriendo que a esta concentración la silimarina tiene un efecto neuroprotector. En nuestro equipo de investigación, en el trabajo de Pérez-H *et al.* (2014) demostraron el efecto neuroprotector de la silimarina a una dosis de 100 mg/Kg durante 5 días de administración intraperitoneal, en un modelo de la enfermedad de Parkinson inducido por la toxina MPTP en ratones C57BL/6J. En el modelo de daño cognitivo, la silimarina conservó las concentraciones de dopamina, disminuyó el número de células apoptóticas (técnica de tunel), y preservó las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. Por estos antecedentes consideramos que la silimarina podría tener un efecto neuroprotector en el modelo de daño cognitivo inducido por la HFD. Se empleó una dosis de 200 mg/Kg al día durante 14 días. Dado que la silimarina es liposoluble se ocupó como vehículo el aceite vegetal y la vía de administración oral, a diferencia de otros modelos en que administran de manera intraperitoneal.

Por otra parte, en nuestros resultados, los grupos que fueron alimentados con HFD, además de incrementar el peso corporal en general (**Figura 9**), también presentaron un incremento de la cantidad de tejido adiposo blanco retroperitoneal (**Figura 12**). Nuestros resultados son consistentes con los de otras investigaciones utilizando modelos similares (Rivera *et al.*, 2013; Sánchez-Sarasúa *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2019; F. Wang *et al.*, 2020).

El grupo de HFD que recibió el tratamiento de silimarina no presentó una disminución del peso en general ni del tejido adiposo (**Figuras 9 y 12**).

Si bien, en nuestros resultados, la silimarina no disminuyó el peso corporal de los animales en los 14 días de tratamiento. En el trabajo de Y. Liu *et al.* (2014) en un protocolo de 20 semanas mostraron que los ratones alimentados con HFD y que recibieron el flavonoide luteolina si tuvieron una disminución

significativa de peso en las últimas dos semanas. Es probable que si se incrementan los tiempos de exposición del tratamiento con silimarina puedan tener un efecto en el peso corporal.

Diversos estudios han demostrado que la HFD modifica la homeostasis de glucosa donde se produce resistencia a la insulina. Esta resistencia a la insulina ocasiona un incremento en los niveles de glucosa en sangre, los cuales predisponen al desarrollo de la diabetes tipo 2 (Sun *et al.*, 2020). En nuestros resultados, la alimentación durante 12 semanas de HFD causó un incremento significativamente mayor en los niveles de glucosa en la sangre de la ratas al ser comparadas con el grupo control. Además, al obtener el área bajo la curva se confirmó que las ratas HFD eran intolerantes a la glucosa (**Figura 10 a y b**). Este resultado era de esperarse por lo reportado previamente en la literatura. Por ejemplo, el trabajo de Sánchez-Sarasúa *et al.* (2016) en ratas Wistar, después de una HFD (60% grasa) durante 12 semanas. En la investigación reportaron un incremento en los niveles de glucosa al ser comparado con las ratas alimentadas con una dieta estándar. Sin embargo, en nuestra investigación desconocíamos el posible efecto benéfico de la silimarina en el metabolismo de glucosa de las ratas HFD. Después del tratamiento con silimarina, solo se encontraron diferencias significativas al 15 minutos entre los grupos HFD+V y HFD+S, siendo 29% menor la concentración de glucosa en el grupo HFD+S. Este resultado sugiere que la silimarina mejoró el metabolismo de glucosa. Es probable que se deba a que la silimarina disminuye la resistencia a la insulina, sin embargo, para comprobar esta hipótesis se debe de realizar una prueba de tolerancia a la insulina. Cabe señalar que, al obtener el área bajo la curva, no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos (**Figura 11 a y b**). Un segundo resultado interesante que llamó la atención, es que el grupo C+S mostró valores de glucosa ligeramente mayores con respecto al grupo C+V, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas en la curva de tolerancia a la glucosa y tampoco en el análisis del área bajo la curva. El resultado de que la silimarina mejora el metabolismo de glucosa, al disminuir los valores de esta en sangre, al menos al minuto 15 es consistente con la evaluación de otros flavonoides que también mejoran los niveles de glucosa sérica (Rivera *et al.*, 2013; Y. Liu *et al.*, 2014).

Por lo anterior, se logró establecer el modelo de obesidad inducido por la HFD, reflejado en el aumento del peso, del tejido adiposo y en la pérdida de la homeostasis de la glucosa, y si bien la silimarina no disminuyó el peso corporal, si presentó un efecto positivo en el metabolismo de glucosa.

Una vez observados los cambios en el metabolismo periférico, la siguiente pregunta fue conocer si la HFD tendría un impacto en las funciones cognitivas y poder evaluar el efecto neuroprotector de la silimarina.

Estudios de investigación en humanos, han demostrado que la diabetes y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Pugazhenti, Qin, y Reddy 2017; Xu, Zhou, y Zhu 2017; Hölscher 2019). El exceso de la ingesta calórica afecta la estructura y función del hipocampo incluyendo la plasticidad sináptica y la neurogénesis, las cuales están vinculadas con el aprendizaje y la memoria (Y. Liu *et al.*, 2014). En el trabajo de Noble *et al.* (2014) en un modelo HFD (45% grasa), de 16 semanas en ratas Sprague Dawley mostraron que disminuye el BDNF en la región CA3 del hipocampo, un área importante para el aprendizaje espacial y contextual. Resultados similares fueron encontrados en el trabajo de Macedo *et al.* (2015) en ratas Wistar en un modelo HFD de 12 semanas, donde observaron menor expresión de BDNF tanto en el hipocampo como en el hipotálamo. El trabajo de Hao *et al.*, (2016) en ratones C57B1/6J después de 12 semanas de HFD observaron que en el hipocampo de estos ratones había mayor microgliosis y menor expresión de proteínas sinápticas (SYP y PSD95), sugiriendo que hay menor transmisión sináptica. Además, en la prueba conductual de objeto novedoso, estos ratones exploraron por menor tiempo el objeto novedoso en comparación con los ratones alimentados con la dieta control, sugiriendo que tienen afectada la memoria. Interesantemente, en el trabajo de Alzoubi *et al.* (2018) en un modelo de obesidad en ratas Wistar inducido por HFD (25% de grasa), en tan solo cuatro semanas de inducción de la HFD, encontraron una afectación en la memoria de corto y largo plazo en la prueba de laberinto radial. Además, al evaluar el hipocampo de estas ratas, encontraron que disminuyó la concentración de GSH y aumentó el GSSH; incrementó la peroxidación lipídica (TBARS) y estaba reducida la actividad de la CAT. Estos resultados permiten especular que el daño en la memoria es consecuencia del EO en el hipocampo. De forma semejante, en el trabajo de Z. Wang *et al.* (2020) pero en ratones C57BL/6J alimentados con una HFD (21% grasa) durante 7 semanas, y a los cuales le realizaron la prueba de memoria de condicionamiento al miedo. Los ratones HFD tenían la memoria afectada, y al analizar bioquímicamente parámetros de EO en el hipocampo, reportaron mayor producción de ROS, menor actividad de la CAT e incremento de la peroxidación lipídica (midieron MDA). Los autores analizaron la expresión de la sinapsina y sinaptofisina, las cuales son proteínas de las vesículas sinápticas, para conocer de manera indirecta la secreción de neurotransmisores. Encontraron

que hay menor concentración de la sinaptofisina en el grupo HFD, sugiriendo que está afectada la neurotransmisión como consecuencia del EO derivado de la HFD.

Con estos antecedentes esperábamos que, en nuestro modelo, el grupo HFD estuviera afectada la memoria y de este modo evaluar el posible efecto benéfico de la silimarina sobre las funciones cognitivas de aprendizaje y memoria a través de tres pruebas conductuales: la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, reconocimiento de objeto novedoso en contexto y el laberinto acuático de Morris (**Figuras 13, 14 y 15**, respectivamente). Cabe mencionar que las tres pruebas conductuales que se llevaron a cabo, evalúan el tipo de memoria explícita (también llamada declarativa), específicamente la episódica, que almacena información relacionada con hechos que contesta las preguntas “¿qué?, ¿cuándo? y ¿dónde?”. La cual depende anatómicamente-funcionalmente del lóbulo temporal medial, que involucra al hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4, giro dentado y el subículo), y las cortezas entorrinal, parahipocampal y perirrinal. Las diferentes áreas que conforman el lóbulo temporal medial desempeñan distintos roles en el sistema de memoria episódica, dependiendo de la información almacenada, es decir, si es un estímulo familiar, de novedad, si son claves espaciales, o estímulos únicos. Estas regiones tienen conexiones eferentes y aferentes con la corteza prefrontal (Eichenbaum 2004; Ergorul y Eichenbaum 2004; Eichenbaum 2017). Es por ello, que se emplearon tres pruebas diferentes para evaluar la memoria episódica.

En nuestro resultados de conducta, los animales HFD+V solo presentaron cambios en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso a corto plazo. Los animales HFD +S mejoraron el desempeño de esta prueba, explorando por más tiempo el objeto novedoso, sugiriendo que tenían mejor memoria al recordar el objeto que habían explorado previamente e interesándose por el novedoso (**Figura 13**). En la prueba de reconocimiento de objeto novedoso participa el hipocampo así como de la corteza perirrinal (Daselaar, Fleck, y Cabeza 2006). Sin embargo, en la misma prueba, pero a largo plazo utilizando las mismas ratas, no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos. Es probable que este resultado se deba a que como las ratas fueron las mismas que en la prueba de corto plazo, esta a su vez, permitió que el objeto familiar, fuera aún más familiar. Es posible especular que el mecanismo por el cual la silimarina mejoró el desempeño en la prueba RON a corto plazo en los HFD, sea por neutralización de las ERON, derivado del EO (Nencini, Giorgi, y Micheli 2007); por disminución de citocinas

proinflamatorias, al preservar las neuronas y/o al evitar la apoptosis de las neuronas. Sin embargo, se requiere de más análisis bioquímicos para confirmar estas hipótesis.

En las pruebas de objeto novedoso en contexto y laberinto acuático de Morris, son pruebas que dependen del hipocampo, del córtex parahipocampal, y córtex entorrinal. En nuestros experimentos, los grupos experimentales no presentaron cambios en la conducta en ambas pruebas; y por tanto el tratamiento de silimarina no presentó en este caso un efecto neuroprotector (**Figuras 14 y 15**). El trabajo de Song *et al.* (2018) en el que utilizan un modelo de daño cerebral ocasionado por el péptido beta amiloide y trataron a las ratas Sprague Dawley dos días después de la cirugía con silibina durante 20 días. Ellos demostraron diferencias en la conducta y la silibina tuvo un efecto neuroprotector tanto en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso como en la prueba de laberinto acuático de Morris utilizando dosis de 50 y 100 mg/kg. En este mismo modelo, demostraron que el tratamiento con silibina disminuye el número de células apoptóticas en el hipocampo. Del mismo modo, en el trabajo de P. Liu *et al.* (2020) encontraron resultados similares en un modelo de deterioro cognitivo y de EO inducido por la inyección cerebro ventricular de estreptozotocina en ratas Sprague-Dawley en las que administraron silibina en tres dosis diferentes (25, 50 y 100 mg/kg) diariamente durante 30 días. En sus resultados observaron que mejoró el desempeño cognitivo evaluado en tres pruebas diferentes (laberinto en T, reconocimiento de objeto novedoso y laberinto acuático de Morris), cuando realizaron la tinción de HE y de Nissl en la región CA1 del hipocampo, mostraron que las neuronas piramidales de las ratas que habían recibido la silibina estaban más saludables y mejor preservadas; también mostraron que la silibina disminuía la muerte neuronal por apoptosis. En otros estudios semejantes pero en ratones C57BL/6 alimentados con HFD durante 20 semanas con 42 % de grasa, se ha observado daño en el hipocampo y cuando administran el flavonoide luteolina (10 mg/Kg) mejora el desempeño en la prueba conductual de laberinto acuático de Morris (Y. Liu *et al.* 2014). Es probable que nuestro modelo de 14 semanas con un porcentaje de 54% de grasa aun no fue suficiente para causar un daño cognitivo, que se viera reflejado en un cambio de la conducta. Por lo tanto, se deben de probar otras condiciones aumentando las semanas de exposición a la HFD para inducir daño cognitivo y también modificar el tiempo de exposición de silimarina para comprobar su efecto neuroprotector.

El sobrepeso y la obesidad repercuten en la fisiología del cerebro provocando el desarrollo de la neuroinflamación y del estrés oxidante, incrementan los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-6 esto afecta la plasticidad sináptica del hipocampo, disminuye la expresión de BDNF y conduce a la atrofia neuronal (Y. Liu *et al.*, 2014). Previamente se ha demostrado que incrementa la producción de ROS en ratones macho de la cepa C57B1/6 después de 28 semanas de HFD (45% grasa) (Freeman *et al.* 2013). También se ha mostrado que el incremento del tejido adiposo reduce la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx en hipocampo (Y. Liu *et al.* 2014).

En nuestro proyecto para conocer el balance REDOX del cerebro por el probable daño derivado de la obesidad, evaluamos el nivel de peroxidación lipídica en la corteza prefrontal y en el hipocampo, evaluadas por ser las responsables del aprendizaje y la memoria, no encontramos diferencias significativas entre los grupos, aunque esperábamos que el grupo HFD presentará niveles más altos de peroxidación como consecuencia del EO (**Figura 16**). Cuando medimos la actividad de enzimas antioxidantes, encontramos que hay mayor actividad de la catalasa en la corteza prefrontal del grupo HFD que recibió el tratamiento de silimarina comparado con los tres grupos restantes (**Figura 17**). También encontramos un incremento en la actividad de la enzima glutatión transferasa en el hipocampo en este caso de los grupos HFD+V y HFD+S, aunque esperábamos que la actividad de estas enzimas antioxidantes estuviese reducida en el grupo HFD como reflejo del daño oxidante (**Figura 18**). Avila-Nava et al. (2017) en un modelo de dieta alta en grasa y sucrosa en ratas Sprague Dawley durante 24 semanas mostraron que incrementa la peroxidación lipídica al incrementar el MDA en el cerebro y disminuye la memoria evaluada en el laberinto en T.

Nuestros resultados en conjunto demuestran que las ratas alimentadas con la HFD desde la semana cuatro presentaron un mayor peso corporal, esta dieta favoreció la acumulación de tejido adiposo blanco. El tratamiento de silimarina no modificó el peso corporal de los animales alimentados con HFD, pero modula el metabolismo periférico de la glucosa al disminuir los niveles de esta en sangre. En los tiempos evaluados, la HFD solo modificó la conducta en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso a corto plazo. A las 14 semanas de HFD aún no hay un daño significativo de EO reflejado en el cerebro, ya que solo se observaron cambios en el incremento la actividad de la catalasa y de la glutatión

S transferasa. Sin embargo, no se descarta el efecto neuroprotector de la silimarina ya que en otros reportes se ha demostrado sus propiedades antioxidantes en el cerebro.

9. Conclusiones

El tratamiento de silimarina no disminuyó el peso corporal de los animales HFD.

El grupo de ratas HFD presentó concentraciones de la glucosa en sangre significativamente mayores al ser comparado con el grupo control. El tratamiento de silimarina solo disminuyó significativamente este incremento al minuto 15.

La memoria en el grupo HFD solo se observó afectada en la prueba RON a corto plazo, y la silimarina mejoró el desempeño de la prueba en el grupo HFD+S.

En general el grupo HFD no mostró indicios de EO en la corteza prefrontal ni en el hipocampo, al no observar cambios en la peroxidación lipídica ni en la actividad de las enzimas antioxidantes.

10. Perspectivas

En nuestra investigación esperábamos poder evaluar el efecto benéfico de la silimarina en un modelo de daño derivado de la HFD, en el metabolismo de glucosa y en las funciones cognitivas. Sin embargo, el modelo por si mismo no presentó los daños que esperábamos encontrar según con lo reportado en la literatura. Si bien, si se observó daño en la periferia en el metabolismo de la glucosa no encontramos daño en el SNC, al menos no reflejado en la memoria que depende de información espacial y del contexto a través de las pruebas de conducta seleccionadas, ni en el EO al evaluar la peroxidación lipídica y la actividad de enzimas antioxidantes. Por lo anterior, es necesario comprender con análisis más sutiles o más sensibles los cambios en la fisiología del SNC particularmente en las regiones del hipocampo y en las cortezas (entorrinal, perirrinal, parahipocampal y prefrontal), a través de evaluar microgliosis, medir citocinas proinflamatoria, producción de ROS, medir producción de los factores de crecimiento (BDNF y NGF), identificar si hay células apoptóticas. Si bien nuestro modelo de inducción de daño por HFD fue en ratas jóvenes, podríamos considerar evaluar el efecto neuroprotector de la silimarina en ratas HFD envejecidas y quizás incrementar los tiempos de exposición al tratamiento. Por otra parte, cabe destacar que la silimarina actuó positivamente en el metabolismo de la glucosa al controlar la glicemia al menos en el minuto 15, por lo que abre un área interesante de estudio al comprender con más detalle este efecto y realizar la prueba de tolerancia a la insulina y conocer mejor el mecanismo.

11. Referencias bibliográficas

- Aguilar Paredes, Oscar Antonio, Citlalli Castillo Guevara, Rubén Díaz Godínez, Antonio Nieto Camacho, y Daniel Méndez Iturbide. 2018. "Antioxidantes e Inhibición de Radicales Libres: Lipoperoxidación y Carbonilación". *Mexican Journal of Biotechnology* 3 (1): 60–72.
- Ahmadinejad, Fereshteh, Simon Geir Møller, Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori, Gholamreza Bidkhor, y Mohammad-Saeid Jami. 2017. "Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress". *Antioxidants* 6 (3): 51. <https://doi.org/10.3390/antiox6030051>.
- Akash, Muhammad Sajid Hamid, Kanwal Rehman, y Aamira Liaqat. 2018. "Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus". *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (1): 105–10. <https://doi.org/10.1002/jcb.26174>.
- Alberts, Bruce, Alexander D. Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, y Peter Walter. 2014. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edición. New York, NY.
- Alzoubi, Karem H., Fadia A. Mayyas, Rania Mahafzah, y Omar F. Khabour. 2018. "Melatonin Prevents Memory Impairment Induced by High-Fat Diet: Role of Oxidative Stress". *Behavioural Brain Research* 336 (enero): 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.047>.
- Avila-Nava, Azalia, Lilia G. Noriega, Armando R. Tovar, Omar Granados, Claudia Perez-Cruz, José Pedraza-Chaverri, y Nimbe Torres. 2017. "Food Combination Based on a Pre-Hispanic Mexican Diet Decreases Metabolic and Cognitive Abnormalities and Gut Microbiota Dysbiosis Caused by a Sucrose-Enriched High-Fat Diet in Rats". *Molecular Nutrition & Food Research* 61 (1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201501023>.
- Balderas, Israela, Carlos J. Rodríguez-Ortiz, Paloma Salgado-Tonda, Julio Chavez-Hurtado, James L. McGaugh, y Federico Bermudez-Rattoni. 2008. "The Consolidation of Object and Context Recognition Memory Involve Different Regions of the Temporal Lobe". *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15 (9): 618–24. <https://doi.org/10.1101/lm.1028008>.
- Barnham, Kevin J., Colin L. Masters, y Ashley I. Bush. 2004. "Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress". *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (3): 205–14. <https://doi.org/10.1038/nrd1330>.
- Bedi, Onkar, Savera Aggarwal, Nirupma Trehanpati, Gayatri Ramakrishna, y Pawan Krishan. 2019. "Molecular and Pathological Events Involved in the Pathogenesis of Diabetes-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease". *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 9 (5): 607–18. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.10.004>.
- Beilharz, J. E., J. Maniam, y M. J. Morris. 2016. "Short-Term Exposure to a Diet High in Fat and Sugar, or Liquid Sugar, Selectively Impairs Hippocampal-Dependent Memory, with Differential Impacts on Inflammation". *Behavioural Brain Research* 306 (junio): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.018>.

- Bhat, Aashiq Hussain, Khalid Bashir Dar, Suhail Anees, Mohammad Afzal Zargar, Akbar Masood, Manzoor Ahmad Sofi, y Showkat Ahmad Ganie. 2015. "Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Neurodegenerative Diseases; a Mechanistic Insight". *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 74 (agosto): 101–10. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>.
- Bocarsly, Miriam E., Maria Fasolino, Gary A. Kane, Elizabeth A. LaMarca, Gregory W. Kirschen, Ilia N. Karatsoreos, Bruce S. McEwen, y Elizabeth Gould. 2015. "Obesity Diminishes Synaptic Markers, Alters Microglial Morphology, and Impairs Cognitive Function". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (51): 15731–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511593112>.
- Borah, Anupom, Rajib Paul, Sabanum Choudhury, Amarendranath Choudhury, Bornalee Bhuyan, Anupam Das Talukdar, Manabendra Dutta Choudhury, y Kochupurackal P. Mohanakumar. 2013. "Neuroprotective Potential of Silymarin against CNS Disorders: Insight into the Pathways and Molecular Mechanisms of Action". *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19 (11): 847–53. <https://doi.org/10.1111/cns.12175>.
- Bruno, Debora S., y Nathan A. Berger. 2020. "Impact of Bariatric Surgery on Cancer Risk Reduction". *Annals of Translational Medicine* 8 (Suppl 1): S13. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.26>.
- Carlberg, I., y B. Mannervik. 1975. "Purification and Characterization of the Flavoenzyme Glutathione Reductase from Rat Liver". *The Journal of Biological Chemistry* 250 (14): 5475–80.
- Carvajal Carvajal, Carlos. 2019. "Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo". *Medicina Legal de Costa Rica* 36 (1): 91–100.
- Chang, Kai-Jyun, Jer-An Lin, Sheng-Yi Chen, Ming-Hung Weng, y Gow-Chin Yen. 2019. "Silymarin Protects against High Fat Diet-Evoked Metabolic Injury by Induction of Glucagon-like Peptide 1 and Sirtuin 1". *Journal of Functional Foods* 56 (mayo): 136–44. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.012>.
- Cignarelli, Angelo, Valentina Annamaria Genchi, Sebastio Perrini, Annalisa Natalicchio, Luigi Laviola, y Francesco Giorgino. 2019. "Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development". *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030759>.
- Cisneros Prego, Elio, Judith Pupo Balboa, y Ela Céspedes Miranda. 1997. "Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa". *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 16 (1): 10–15.
- Daselaar, S. M., M. S. Fleck, y R. Cabeza. 2006. "Triple Dissociation in the Medial Temporal Lobes: Recollection, Familiarity, and Novelty". *Journal of Neurophysiology* 96 (4): 1902–11. <https://doi.org/10.1152/jn.01029.2005>.
- Datusalia, Ashok Kumar, y Shyam Sunder Sharma. 2014. "Amelioration of Diabetes-Induced Cognitive Deficits by GSK-3 β Inhibition Is Attributed to Modulation of Neurotransmitters and Neuroinflammation". *Molecular Neurobiology* 50 (2): 390–405. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8632-x>.

- Davidson, Terry L., Andrew Monnot, Adelai U. Neal, Ashley A. Martin, J. Josiah Horton, y Wei Zheng. 2012. "The Effects of a High-energy Diet on Hippocampal-dependent Discrimination Performance and Blood-brain Barrier Integrity Differ for Diet-induced Obese and Diet-Resistant Rats". *Physiology & behavior* 107 (1): 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.015>.
- Di Meo, Francesco, Anna Valentino, Orsolina Petillo, Gianfranco Peluso, Stefania Filosa, y Stefania Crispi. 2020. "Bioactive Polyphenols and Neuromodulation: Molecular Mechanisms in Neurodegeneration". *International Journal of Molecular Sciences* 21 (7): E2564. <https://doi.org/10.3390/ijms21072564>.
- Dijk, Gertjan van, Steffen van Heijningen, Aaffien C. Reijne, Csaba Nyakas, Eddy A. van der Zee, y Ulrich L. M. Eisel. 2015. "Integrative Neurobiology of Metabolic Diseases, Neuroinflammation, and Neurodegeneration". *Frontiers in Neuroscience* 9: 173. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00173>.
- Domjan, Michael P. 2014. *Principios de Aprendizaje y Conducta*. Sexta. Texas: Cengage Learning.
- Drake, Caroline, Hervé Boutin, Matthew S. Jones, Adam Denes, Barry W. McColl, Johann R. Selvarajah, Sharon Hulme, et al. 2011. "Brain Inflammation Is Induced by Co-Morbidities and Risk Factors for Stroke". *Brain, Behavior, and Immunity* 25 (6): 1113–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.008>.
- Du, Liyu, Xi Lei, Jie Wang, Li Wang, Qingping Zhong, Xiang Fang, Pan Li, Bing Du, Yutao Wang, y Zhenlin Liao. 2021. "Lipopolysaccharides derived from gram-negative bacterial pool of human gut microbiota promote inflammation and obesity development". *International Reviews of Immunology* 0 (0): 1–12. <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1996573>.
- Eichenbaum, Howard. 2004. "Hippocampus: Cognitive Processes and Neural Representations That Underlie Declarative Memory". *Neuron* 44 (1): 109–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.028>.
- . 2017. "Prefrontal-Hippocampal Interactions in Episodic Memory". *Nature Reviews. Neuroscience* 18 (9): 547–58. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.74>.
- Engin, Atilla. 2017. "Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 960: 305–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_13.
- Ennaceur, A., y J. Delacour. 1988. "A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. 1: Behavioral Data". *Behavioural Brain Research* 31 (1): 47–59.
- Ergorul, Ceren, y Howard Eichenbaum. 2004. "The Hippocampus and Memory for 'What,' 'Where,' and 'When'". *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 11 (4): 397–405. <https://doi.org/10.1101/lm.73304>.
- Esteve Ràfols, Montserrat. 2014. "Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional". *Endocrinología y Nutrición* 61 (2): 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>.

- Fantuzzi, Giamila. 2005. "Adipose Tissue, Adipokines, and Inflammation". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (5): 911–19; quiz 920. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.023>.
- Feng, Bin, Ran Meng, Bin Huang, Shanmei Shen, Yan Bi, y Dalong Zhu. 2016. "Silymarin Alleviates Hepatic Oxidative Stress and Protects against Metabolic Disorders in High-Fat Diet-Fed Mice". *Free Radical Research* 50 (3): 314–27. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1116689>.
- Fischer, Roman, Olaf Maier, Martin Siegemund, Harald Wajant, Peter Scheurich, y Klaus Pfizenmaier. 2011. "A TNF Receptor 2 Selective Agonist Rescues Human Neurons from Oxidative Stress-Induced Cell Death". *PLOS ONE* 6 (11): e27621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027621>.
- Francisco, Vera, Jesús Pino, Victor Campos-Cabaleiro, Clara Ruiz-Fernández, Antonio Mera, Miguel A. Gonzalez-Gay, Rodolfo Gómez, y Oreste Gualillo. 2018. "Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin". *Frontiers in Physiology* 9: 640. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00640>.
- Freeman, Linnea R, y Ann-Charlotte E Granholm. 2012. "Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet". *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32 (4): 643–53. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.168>.
- Freeman, Linnea R., Le Zhang, Anand Nair, Kalavathi Dasuri, Joseph Francis, Sun-Ok Fernandez-Kim, Annadora J. Bruce-Keller, y Jeffrey N. Keller. 2013. "Obesity Increases Cerebrocortical Reactive Oxygen Species and Impairs Brainfunction". *Free Radical Biology and Medicine* 56 (marzo): 226–33. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.577>.
- Galhardi, F., K. Mesquita, J. M. Monserrat, y D. M. Barros. 2009. "Effect of Silymarin on Biochemical Parameters of Oxidative Stress in Aged and Young Rat Brain". *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (10): 2655–60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.030>.
- Gérard-Monnier, D., I. Erdelmeier, K. Régnard, N. Moze-Henry, J. C. Yadan, y J. Chaudière. 1998. "Reactions of 1-Methyl-2-Phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation". *Chemical Research in Toxicology* 11 (10): 1176–83. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>.
- Gil Hernández, Ángel. 2017. *Tratado de Nutrición: Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas d. 3º*. Vol. 1. 3 vols. Panamericana. <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/6014/Tratado-de-Nutricion.html>.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, y W. B. Jakoby. 1974. "Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation". *The Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130–39.
- Haddadi, Rasool, Zahra Shahidi, y Shahla Eyvari-Brooshghalan. 2020. "Silymarin and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Potential and Basic Molecular Mechanisms". *Phytomedicine* 79 (diciembre): 153320. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153320>.
- Hall, Edward D., y Jeffrey M. Bosken. 2009. "Measurement of Oxygen Radicals and Lipid Peroxidation in Neural Tissues". *Current Protocols in Neuroscience* Chapter 7 (julio): Unit 7.17.1-51. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0717s48>.

- Hao, Shuai, Aditi Dey, Xiaolin Yu, y Alexis M. Stranahan. 2016. "Dietary Obesity Reversibly Induces Synaptic Stripping by Microglia and Impairs Hippocampal Plasticity". *Brain, Behavior, and Immunity* 51 (enero): 230–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.023>.
- Hauck, Amy K., Yimao Huang, Ann V. Hertzog, y David A. Bernlohr. 2019. "Adipose oxidative stress and protein carbonylation". *The Journal of Biological Chemistry* 294 (4): 1083–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003214>.
- Hirayama, Koki, Hideki Oshima, Akiko Yamashita, Kaoru Sakatani, Atsuo Yoshino, y Yoichi Katayama. 2016. "Neuroprotective Effects of Silymarin on Ischemia-Induced Delayed Neuronal Cell Death in Rat Hippocampus". *Brain Research* 1646 (septiembre): 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.06.018>.
- Hölscher, Christian. 2019. "Insulin Signaling Impairment in the Brain as a Risk Factor in Alzheimer's Disease". *Frontiers in Aging Neuroscience* 11: 88. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00088>.
- Hotamisligil, Gökhan S., Pascal Peraldi, Adriane Budavari, Ramsey Ellis, Morris F. White, y Bruce M. Spiegelman. 1996. "IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α - and Obesity-Induced Insulin Resistance". *Science* 271 (5249): 665–70. <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.665>.
- Hou, Yu-Chang, Kuo-Tong Liou, Chang-Ming Chern, Yea-Hwey Wang, Jyh-Fei Liao, Shiou Chang, Yuan-Hwa Chou, y Yuh-Chiang Shen. 2010. "Preventive Effect of Silymarin in Cerebral Ischemia-Reperfusion-Induced Brain Injury in Rats Possibly through Impairing NF-KB and STAT-1 Activation". *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 17 (12): 963–73. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.03.012>.
- Ighodaro, O. M., y O. A. Akinloye. 2018. "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid". *Alexandria Journal of Medicine* 54 (4): 287–93. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- Kang, Dong Ho, Rok Won Heo, Chin-Ok Yi, Hwajin Kim, Chang Hwa Choi, y Gu Seob Roh. 2015. "High-Fat Diet-Induced Obesity Exacerbates Kainic Acid-Induced Hippocampal Cell Death". *BMC Neuroscience* 16 (octubre): 72. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0202-2>.
- Kang, E.-B., J.-H. Koo, Y.-C. Jang, C.-H. Yang, Y. Lee, L. M. Cosio-Lima, y J.-Y. Cho. 2016. "Neuroprotective Effects of Endurance Exercise Against High-Fat Diet-Induced Hippocampal Neuroinflammation". *Journal of Neuroendocrinology* 28 (5). <https://doi.org/10.1111/jne.12385>.
- Kershaw, Erin E., y Jeffrey S. Flier. 2004. "Adipose Tissue as an Endocrine Organ". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (6): 2548–56. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>.
- Kim, Mi Hye, Sung-Hoon Kim, y Woong Mo Yang. 2014. "Mechanisms of Action of Phytochemicals from Medicinal Herbs in the Treatment of Alzheimer's Disease". *Planta Medica* 80 (15): 1249–58. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383038>.

- Kim, Yoona, Jennifer B. Keogh, y Peter M. Clifton. 2016. "Polyphenols and Glycemic Control". *Nutrients* 8 (1): E17. <https://doi.org/10.3390/nu8010017>.
- Köbe, Theresa, A. Veronica Witte, Ariane Schnelle, Valentina A. Tesky, Johannes Pantel, Jan-Philipp Schuchardt, Andreas Hahn, Jens Bohlken, Ulrike Grittner, y Agnes Flöel. 2017. "Impact of Resveratrol on Glucose Control, Hippocampal Structure and Connectivity, and Memory Performance in Patients with Mild Cognitive Impairment". *Frontiers in Neuroscience* 11: 105. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00105>.
- Lang, Bradley T., Yiping Yan, Robert J. Dempsey, y Raghu Vemuganti. 2009. "Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats". *Brain research* 1258 (marzo): 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.026>.
- Lawrence, Richard A., y Raymond F. Burk. 1976. "Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71 (4): 952–58. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90747-6).
- Lee, Byung-Cheol, y Jongsoo Lee. 2014. "Cellular and Molecular Players in Adipose Tissue Inflammation in the Development of Obesity-Induced Insulin Resistance". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1842 (3): 446–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.017>.
- Lee, Thomas Ho-yin, y Suk-yu Yau. 2020. "From Obesity to Hippocampal Neurodegeneration: Pathogenesis and Non-Pharmacological Interventions". *International Journal of Molecular Sciences* 22 (1): 201. <https://doi.org/10.3390/ijms22010201>.
- Liu, Panwen, Lingyu Cui, Bo Liu, Weiwei Liu, Toshihiko Hayashi, Kazunori Mizuno, Shunji Hattori, Yuko Ushiki-Kaku, Satoshi Onodera, y Takashi Ikejima. 2020. "Silibinin Ameliorates STZ-Induced Impairment of Memory and Learning by up-Regulating Insulin Signaling Pathway and Attenuating Apoptosis". *Physiology & Behavior* 213 (enero): 112689. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112689>.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, y Shao-Cong Sun. 2017. "NF-KB Signaling in Inflammation". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (1): 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- Liu, Yi, Xiaobin Fu, Nuo Lan, Sai Li, Jingzheng Zhang, Shuaishuai Wang, Cheng Li, Yanguo Shang, Tonghui Huang, y Ling Zhang. 2014. "Luteolin Protects against High Fat Diet-Induced Cognitive Deficits in Obesity Mice". *Behavioural Brain Research* 267 (julio): 178–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.040>.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, y R. J. Randall. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75.
- Lu, P., T. Mamiya, L. L. Lu, A. Mouri, Lb Zou, T. Nagai, M. Hiramatsu, T. Ikejima, y T. Nabeshima. 2009. "Silibinin Prevents Amyloid Beta Peptide-Induced Memory Impairment and Oxidative Stress in Mice". *British Journal of Pharmacology* 157 (7): 1270–77. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00295.x>.

- Ma, Weiwei, Linhong Yuan, Huanling Yu, Yuandi Xi, y Rong Xiao. 2014. "Mitochondrial Dysfunction in Obesity". *Life Sciences* 110 (2): 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.018>.
- Macedo, I. C., J. R. Rozisky, C. Oliveira, C. M. Oliveira, G. Laste, Y. Nonose, V. S. Santos, et al. 2015. "Chronic Stress Associated with Hypercaloric Diet Changes the Hippocampal BDNF Levels in Male Wistar Rats". *Neuropeptides* 51 (junio): 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.01.002>.
- Maury, E., y S. M. Brichard. 2010. "Adipokine Dysregulation, Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Syndrome". *Molecular and Cellular Endocrinology* 314 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.031>.
- Mello, Aline Haas de, Ana Beatriz Costa, Jéssica Della Giustina Engel, y Gislaïne Tezza Rezin. 2018a. "Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in the Brain of Diet-Induced Obese Rats but Not in Diet-Resistant Rats". *Life Sciences* 192 (enero): 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.019>.
- Morris, Richard. 1984. "Developments of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in the Rat". *Journal of Neuroscience Methods* 11 (1): 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
- Navarrete, F., J. M. Pérez-Ortiz, T. Femenía, M. S. García-Gutiérrez, M. E. García-Payá, C. Leiva-Santana, y J. Manzanares. 2008. "[Methods to evaluate cognitive disorders in animal models]". *Revista De Neurologia* 47 (3): 137–45.
- Nencini, C., G. Giorgi, y L. Micheli. 2007. "Protective Effect of Silymarin on Oxidative Stress in Rat Brain". *Phytomedicine* 14 (2): 129–35. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.02.005>.
- Noble, Emily E., Vijayakumar Mavanji, Morgan R. Little, Charles J. Billington, Catherine M. Kotz, y ChuanFeng Wang. 2014. "Exercise Reduces Diet-Induced Cognitive Decline and Increases Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor in CA3 Neurons". *Neurobiology of Learning and Memory* 114 (octubre): 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.04.006>.
- Oberley, Larry W., y Douglas R. Spitz. 1984. "[61] Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue". En *Methods in Enzymology*, 105:457–64. *Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05064-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05064-3).
- Oliveira, Camila, Erika Aparecida Silveira, Lorena Rosa, Annelisa Santos, Ana Paula Rodrigues, Carolina Mendonça, Lucas Silva, Paulo Gentil, y Ana Cristina Rebelo. 2020. "Risk Factors Associated with Cardiac Autonomic Modulation in Obese Individuals". *Journal of Obesity* 2020 (marzo). <https://doi.org/10.1155/2020/7185249>.
- Ott, Martin, Vladimir Gogvadze, Sten Orrenius, y Boris Zhivotovsky. 2007. "Mitochondria, Oxidative Stress and Cell Death". *Apoptosis* 12 (5): 913–22. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>.
- Paredes, Oscar, Citlalli Castillo-Guevara, Rubén Díaz-Godínez, Antonio Nieto-Camacho, y Daniel Méndez-Iturbide. 2018. "Antioxidants and inhibition of free radicals: lipoperoxidation and carbonylation". *Mexican Journal of Biotechnology* 3 (enero): 60–72. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.60>.

- Paul, Carrillo-Mora, Giordano Magda, y Santamaría Abel. 2009. "Spatial Memory: Theoretical Basis and Comparative Review on Experimental Methods in Rodents". *Behavioural Brain Research* 203 (2): 151–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.022>.
- Pérez-H, Jesús, Carlos Carrillo-S, Esperanza García, Gabriela Ruiz-Mar, Ruy Pérez-Tamayo, y Anahí Chavarría. 2014. "Neuroprotective Effect of Silymarin in a MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease". *Toxicology* 319 (mayo): 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.02.009>.
- Pérez-Hernández, Jesús, Víctor Javier Zaldívar-Machorro, David Villanueva-Porras, Elisa Vega-Ávila, y Anahí Chavarría. 2016. "A Potential Alternative against Neurodegenerative Diseases: Phytodrugs". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8378613>.
- Pignatelli, Pasquale, Roberto Carnevale, y Danilo Menichelli. 2019. "Silybin and Metabolic Disorders". *Internal and Emergency Medicine* 14 (1): 1–3. <https://doi.org/10.1007/s11739-018-1968-x>.
- Pizzino, Gabriele, Natasha Irrera, Mariapaola Cucinotta, Giovanni Pallio, Federica Mannino, Vincenzo Arcoraci, Francesco Squadrito, Domenica Altavilla, y Alessandra Bitto. 2017. "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- Pryor, William A. 1976. "CHAPTER 1 - The Role of Free Radical Reactions in Biological Systems". En *Free Radicals in Biology*, editado por William A. Pryor, 1–49. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-566501-8.50008-0>.
- Pugazhenthii, Subbiah, Limei Qin, y P. Hemachandra Reddy. 2017. "Common Neurodegenerative Pathways in Obesity, Diabetes, and Alzheimer's Disease". *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1863 (5): 1037–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017>.
- Quillfeldt, Jorge Alberto. 2016. "Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats". En *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*, editado por Monica Levy Andersen y Sergio Tufik, 271–311. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11578-8_17.
- Rivera, Patricia, Margarita Pérez-Martín, Francisco J. Pavón, Antonia Serrano, Ana Crespillo, Manuel Cifuentes, María-Dolores López-Ávalos, et al. 2013. "Pharmacological Administration of the Isoflavone Daidzein Enhances Cell Proliferation and Reduces High Fat Diet-Induced Apoptosis and Gliosis in the Rat Hippocampus". *PLOS ONE* 8 (5): e64750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064750>.
- Sánchez-Sarasúa, Sandra, Salma Moustafa, Álvaro García-Avilés, María Fernanda López-Climent, Aurelio Gómez-Cadenas, Francisco E. Olucha-Bordonau, y Ana M. Sánchez-Pérez. 2016. "The Effect of Abscisic Acid Chronic Treatment on Neuroinflammatory Markers and Memory in a Rat Model of High-Fat Diet Induced Neuroinflammation". *Nutrition & Metabolism* 13: 73. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0137-3>.

- Shimada, Kenichi, Timothy R. Crother, Justin Karlin, Jargalsaikhan Dagvadorj, Norika Chiba, Shuang Chen, V. Krishnan Ramanujan, et al. 2012. "Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis". *Immunity* 36 (3): 401–14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>.
- Song, Xiaoyu, Bo Liu, Lingyu Cui, Biao Zhou, Lu Liu, Weiwei Liu, Guodong Yao, et al. 2018. "Estrogen Receptors Are Involved in the Neuroprotective Effect of Silibinin in A β 1-42-Treated Rats". *Neurochemical Research* 43 (4): 796–805. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2481-3>.
- Spagnuolo, Maria Stefania, Maria Pina Mollica, Bernardetta Maresca, Gina Cavaliere, Carolina Cefaliello, Giovanna Trinchese, Rosaria Scudiero, Marianna Crispino, y Luisa Cigliano. 2015. "High Fat Diet and Inflammation – Modulation of Haptoglobin Level in Rat Brain". *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00479>.
- Steckler, T., W. H. Drinkenburg, A. Sahgal, y J. P. Aggleton. 1998. "Recognition Memory in Rats--I. Concepts and Classification". *Progress in Neurobiology* 54 (3): 289–311. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00060-9](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00060-9).
- Sun, Yanan, Cao Ma, Hui Sun, Huan Wang, Wei Peng, Zibo Zhou, Hongwei Wang, Chenchen Pi, Yingai Shi, y Xu He. 2020. "Metabolism: A Novel Shared Link between Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease". *Journal of Diabetes Research* 2020: 4981814. <https://doi.org/10.1155/2020/4981814>.
- Tajmohammadi, Atefeh, Bibi Marjan Razavi, y Hossein Hosseinzadeh. 2018. "Silybum Marianum (Milk Thistle) and Its Main Constituent, Silymarin, as a Potential Therapeutic Plant in Metabolic Syndrome: A Review". *Phytotherapy Research: PTR* 32 (10): 1933–49. <https://doi.org/10.1002/ptr.6153>.
- Tanaka, Hirofumi, Drew D. Gourley, Maria Dekhtyar, y Andreeana P. Haley. 2020. "Cognition, Brain Structure, and Brain Function in Individuals with Obesity and Related Disorders". *Current Obesity Reports* 9 (4): 544–49. <https://doi.org/10.1007/s13679-020-00412-y>.
- Torres, Wilhelm. 2002. "Biología de las especies de oxígeno reactivas", enero.
- Trouillas, Patrick, Philippe Marsal, Alena Svobodová, Jitka Vostálová, Radek Gažák, Jan Hrbáč, Petr Sedmera, et al. 2008. "Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study". *The Journal of Physical Chemistry A* 112 (5): 1054–63. <https://doi.org/10.1021/jp075814h>.
- Tucsek, Zsuzsanna, Peter Toth, Danuta Sosnowska, Tripti Gautam, Matthew Mitschelen, Akos Koller, Gabor Szalai, William E. Sonntag, Zoltan Ungvari, y Anna Csiszar. 2014. "Obesity in Aging Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption, Neuroinflammation, and Oxidative Stress in the Mouse Hippocampus: Effects on Expression of Genes Involved in Beta-Amyloid Generation and Alzheimer's Disease". *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 69 (10): 1212–26. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt177>.

- Viktorova, Jitka, Milena Stranska-Zachariasova, Marie Fenclova, Libor Vitek, Jana Hajslova, Vladimir Kren, y Tomas Ruml. 2019. "Complex Evaluation of Antioxidant Capacity of Milk Thistle Dietary Supplements". *Antioxidants* 8 (8): 317. <https://doi.org/10.3390/antiox8080317>.
- Vuong, Billy, Gary Odero, Stephanie Rozbacher, Mackenzie Stevenson, Stephanie M. Kereliuk, Troy J. Pereira, Vernon W. Dolinsky, y Tiina M. Kauppinen. 2017. "Exposure to Gestational Diabetes Mellitus Induces Neuroinflammation, Derangement of Hippocampal Neurons, and Cognitive Changes in Rat Offspring". *Journal of Neuroinflammation* 14 (1): 80. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0859-9>.
- Walling, Cheves. 1998. "Intermediates in the Reactions of Fenton Type Reagents". *Accounts of Chemical Research* 31 (4): 155–57. <https://doi.org/10.1021/ar9700567>.
- Wang, Fei, Shuchun Chen, Luping Ren, Yichao Wang, Zelin Li, Tiantian Song, He Zhang, y Qiwen Yang. 2020. "The Effect of Silibinin on Protein Expression Profile in White Adipose Tissue of Obese Mice". *Frontiers in Pharmacology* 11: 55. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00055>.
- Wang, Zhao-Wen. 2008. "Regulation of Synaptic Transmission by Presynaptic CaMKII and BK Channels". *Molecular Neurobiology* 38 (2): 153–66. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8039-7>.
- Wang, Zhengjun, Qian Ge, Yuwei Wu, Jinming Zhang, Qiaofen Gu, y Jing Han. 2020. "Impairment of Long-Term Memory by a Short-Term High-Fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity". *Neuroscience* 424 (enero): 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.10.050>.
- Woo, Jinhee, Ki Ok Shin, So Young Park, Ki Soeng Jang, y Sunghwun Kang. 2013. "Effects of Exercise and Diet Change on Cognition Function and Synaptic Plasticity in High Fat Diet Induced Obese Rats". *Lipids in Health and Disease* 12 (octubre): 144. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-144>.
- Xu, Youhua, Hua Zhou, y Quan Zhu. 2017. "The Impact of Microbiota-Gut-Brain Axis on Diabetic Cognition Impairment". *Frontiers in Aging Neuroscience* 9: 106. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00106>.
- Yahfoufi, Nour, Nawal Alsadi, Majed Jambi, y Chantal Matar. 2018. "The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols". *Nutrients* 10 (11): E1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>.
- Yamasaki, Keishi, Hiroki Sato, Saori Minagoshi, Karin Kyubun, Makoto Anraku, Shigeyuki Miyamura, Hiroshi Watanabe, et al. 2017. "The Binding of Silibinin, the Main Constituent of Silymarin, to Site I on Human Serum Albumin". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 40 (3): 310–17. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00790>.
- Yin, Jun, Zhanguo Gao, Qing He, Dequan Zhou, ZengKui Guo, y Jianping Ye. 2009. "Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296 (2): E333–42. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90760.2008>.

- Yön, Burcu, Muaz Belviranlı, y Nilsel Okudan. 2019. "The Effect of Silymarin Supplementation on Cognitive Impairment Induced by Diabetes in Rats". *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 30 (4). <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0109>.
- Zhou, Yue, Jie Zheng, Ya Li, Dong-Ping Xu, Sha Li, Yu-Ming Chen, y Hua-Bin Li. 2016. "Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer". *Nutrients* 8 (8): E515. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>.