



UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

ESCUELA DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Licenciatura en Medicina

Propuesta de Investigación

“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA TeTx SOBRE LA RESPUESTA OXIDATIVA E INFLAMATORIA EN NEURONAS HIPOCAMPALES EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO CON SÍNDROME METABÓLICO Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO”

PRESENTA

Itzel Ortiz Flores

ID. 152340

Director(es):

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Díaz Fonseca', is written over a horizontal line.

Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca

Director experto

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Mares Morales', is written over a horizontal line.

Dr. Roberto Carlos Mares Morales

Director metodológico

Agosto 2021

Índice Principal

Índice de Figuras	4
Índice de Mapas.....	4
Índice de Tablas.....	5
Índice de Esquemas	5
Directores.....	6
Agradecimientos	7
Abreviaturas.....	8
1. Antecedentes generales	10
1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles	10
1.1.1. Epidemiología actual a nivel mundial y nacional	10
1.1.2. Las ECNT durante el proceso de envejecimiento	11
1.2. Síndrome metabólico.....	12
1.2.1. Concepto del “Síndrome metabólico”	12
1.2.2. Síndrome metabólico como problema de salud pública	12
1.2.3. Fisiopatología del síndrome metabólico: De lo molecular a lo clínico.....	13
1.2.4. Criterios diagnósticos	22
1.3. Hipocampo.....	23
1.3.1. Anatomía del hipocampo.....	23
1.3.2. Morfología y función de las neuronas hipocampales	26
1.3.3. Circuito trisináptico	28
1.3.4. Rol del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria	30
1.3.5. Potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD).....	31
1.3.6. Rol del BDNF en la LTP	33
1.3.7. Hipocampo en el envejecimiento y el síndrome metabólico	36
2. Antecedentes específicos	40
2.1. Neurotoxinas clostridiales	40
2.2. Toxina tetánica	41
2.2.1. Síntesis, estructura y mecanismo de acción de la toxina tetánica	41
2.3. H _C -TeTx: Importancia, transporte y mecanismo de acción	44
2.4. Evidencia actual sobre el uso del HC-TeTx en el SNC	48
3. Planteamiento del problema	51

4.	Pregunta de investigación	53
5.	Justificación	54
6.	Hipótesis	55
6.1.	Hipótesis de investigación (Hi)	55
6.2.	Hipótesis nula (Ho)	55
7.	Objetivos	56
7.1.	Objetivo general	56
7.2.	Objetivos específicos	56
8.	Diagrama metodológico	57
9.	Metodología	57
9.1.	Tipo de estudio	57
9.2.	Universo	57
9.3.	Unidad de análisis	58
9.4.	Criterios de inclusión y exclusión	58
9.4.1.	Criterios de inclusión	58
9.4.2.	Criterios de exclusión	58
9.5.	Variables por estudiar	58
9.6.	Inducción a síndrome metabólico	58
9.7.	Administración de HC-TeTx	59
9.8.	Zoometría	59
9.9.	Pruebas conductuales	60
9.10.	Determinaciones bioquímicas	61
9.11.	Eutanasia	62
9.12.	Técnicas para determinar estrés oxidativo en hipocampo	62
9.13.	Análisis estadístico	63
9.14.	Consideraciones éticas	63
9.15.	Financiamiento del proyecto	64
10.	Resultados	65
10.1.	Variables zoométricas	65
10.2.	Pruebas conductuales	65
10.3.	Pruebas bioquímicas	69
10.4.	Variables de estrés oxidativo e inflamación	73

11. Discusión	76
12. Conclusiones	82
13. Anexos.....	83
13.1. Cronograma de actividades (Original)	83
13.2. Cronograma de actividades (Modificado a contingencia sanitaria).....	84
13.3. Comprobante del CICUAL.....	85
13.4. Bioseguridad.....	86
14. Referencias	87

Índice de Figuras

Figura 1-1 Generalidades de la insulina, su receptor y vías de señalización	17
Figura 1-2 Insulina a nivel del SNC.....	20
Figura 1-3 Anatomía del hipocampo	24
Figura 1-4 Organización laminar del hipocampo	25
Figura 1-5 Neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3	27
Figura 1-6 Célula granular del GD	28
Figura 1-7 Esquema del circuito trisináptico	29
Figura 1-8 Representación esquemática de la LTP.....	33
Figura 1-9 Receptores Trks y p75NTr.....	34
Figura 2-1 Representación esquemática de la toxina tetánica y sus dominios	42
Figura 2-2 Representación gráfica de la estructura cristalina de la toxina tetánica.....	42
Figura 2-3 Estructura terciaria del H _C -TeTx	43
Figura 2-4 Complejo SNARE.....	44
Figura 2-5 Internalización y transporte retrógrado del H _C -TeTx.....	47
Figura 2-6 Interacción del fragmento H _C -TeTx con receptores de neurotrofinas.....	47
Figura 8-1 Diagrama metodológico	57
Figura 9-1 Dieta PicoLab ® Rodent Diet 20 5053.....	59
Figura 9-2 Campo abierto.....	60
Figura 10-1 Fase 1: Habitación y evaluación de la actividad motora	66
Figura 10-2 Trayectoria recorrida.....	67
Figura 10-3 Fase 2: Reconocimiento de objetos familiares.....	67
Figura 10-4 Fase 3: Reconocimiento de objetos novedosos y evaluación de memoria a corto plazo.....	68
Figura 10-5 Fase 4: Reconocimiento de objetos novedosos y evaluación de memoria a largo plazo.....	69
Figura 10-6 Efecto de la administración de la H _C -TeTx sobre los parámetros bioquímicos.....	73
Figura 10-7 Variables de estrés oxidativo	75
Figura 10-8 Variables de inflamación.....	75

Índice de Mapas

Mapa 1-1 Número de personas mayores de 65 años con diabetes en 2019	18
---	----

Índice de Tablas

Tabla 1-1 Adipocinas y su rol en la fisiopatología de la resistencia a la insulina (RI) y síndrome metabólico.	15
Tabla 1-2 Valores de referencia para diagnóstico de sobrepeso y obesidad en población mexicana.....	16
Tabla 1-3 Criterios diagnósticos para síndrome metabólico.....	23
Tabla 10-1 Análisis de variables zoométricas.....	65
Tabla 10-2 Análisis de valores bioquímicos.....	70
Tabla 10-3 Parámetros de estrés oxidativo e inflamación.....	74

Índice de Esquemas

Esquema 1 Vínculo fisiopatológico entre el SM y la EA.	39
---	----

Directores

Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca

Director experto

- Formación
 - Posdoctorado - Laboratorio de Neuropsiquiatría del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).
 - Doctorado - Ciencias Químicas, en el área de Bioquímica y Biología Molecular. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Cédula profesional: 8632443
 - Maestría - Ciencias Químicas, en el área de Bioquímica y Biología Molecular. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Cédula profesional: 6761886
 - Licenciatura - Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Cédula profesional: 5224340
- Correo electrónico: alfonso.diaz@correo.buap.mx

Dr. Roberto Carlos Mares

Director metodológico

- Formación
 - Licenciatura en Médico Cirujano y Partero, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).
 - Especialidad en Cirugía Plástica y Reconstructiva
 - Director Académico de la Licenciatura en Médico Cirujano de la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP)
 - Profesor de Tiempo completo de la Universidad de las Américas Puebla
- Correo electrónico: roberto.mares@udlap.mx

Agradecimientos

A mis padres, Ing. N. Gilberto Ortiz Hernández y Yenizeth P. Flores Rodríguez, quienes siempre han creído en mí y me han brindado todo su apoyo y amor desde el primer día. Gracias por los consejos sobre todo en los momentos más difíciles y por estar a mi lado en cada uno de mis logros porque sin ustedes ninguno de éstos hubiera sido posible. Los amo, respeto y admiro.

A mi hermana, Lic. Denisse Ortiz Flores, quien es el mejor regalo que mis padres y la vida me han dado. Gracias por acompañarme en cada paso, por escucharme, aconsejarme y desvelarte conmigo estudiando y brindándome palabras de aliento. Además, gracias por ser mi mejor amiga. Te quiero y te admiro desde siempre.

A mi colega y novio, Dr. Jesús A. Carrasco, quien me ha brindado todo su apoyo, paciencia y amor; y ha estado conmigo celebrando cada uno de mis logros y tomando mi mano en los momentos difíciles. Te admiro, te respeto y te quiero.

A mi mejor amigo, Ing. Cristian Salazar, quien a pesar de la distancia siempre busca mil formas para estar presente. Gracias por enseñarme el verdadero significado de la amistad y por estar conmigo en todo momento, por tus consejos y por las palabras de ánimo que siempre me das. Te quiero y te admiro, gracias por estar en mi vida.

A todos mis maestros, que me han formado desde que inicié mi vida estudiantil ya que gracias a su vocación, paciencia y constancia; he logrado ser una estudiante responsable y comprometida con cada cosa que realizo.

Al Dr. Alfonso Díaz, quien considero es un gran ser humano, profesional, maestro y amigo. Gracias por su paciencia, consejos, enseñanzas y sobretodo por confiar en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía. Siempre agradeceré la oportunidad de haber trabajado con usted.

Al Dr. Roberto C. Mares, quien considero es un excelente ser humano y médico, maestro y amigo. Gracias por sus consejos, enseñanzas y por brindarme su apoyo en cada paso de mi carrera.

Abreviaturas

AGL:	Ácidos grasos libres
Akt:	Proteína cinasa B
AMPA:	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE:	Barrera hematoencefálica
BoNT:	Neurotoxina botulínica
CaMKII:	Calcio/calmodulina proteína quinasa II
CE:	Corteza entorrinal
CNTs:	Neurotoxinas clostridiales
E-LTP:	Fase temprana de la potenciación a largo plazo
EA:	Enfermedad de Alzheimer
ECNT:	Enfermedad crónica no transmisible
ERN:	Especies reactivas de Nitrógeno
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
GAL:	Galactosa
GalNac:	N-Acetilgalactosamina
GD:	Giro dentado
HAS:	Hipertensión arterial sistémica
Hc-TeTx:	subdomino del fragmento C-terminal de la toxina tetánica
HC:	Heavy chain / cadena pesada
ICC:	Índice cintura – cadera
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
IMC:	Índice de masa corporal
IRS-1:	Sustrato 1 del receptor de insulina
ISBG:	Inflamación sistémica de bajo grado
kDa:	Kilodalton
L-LTP:	Fase tardía de la potenciación a largo plazo
LAC:	Lactosa
LC:	Light chain / cadena ligera
LDL:	Low density lipoproteins / Lipoproteína de baja densidad
LTD:	depresión a largo plazo
LTD:	Long-term depression / Depresión a largo plazo
LTP:	Potenciación a largo plazo
LTP:	Long-term potentiation / Potenciación a largo plazo

MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinases / proteínas quinasa activadas por mitógeno
NMDA:	Receptor de N-metil-D-aspartato
NSF:	Factor sensible a la N-etilmaleimida
NTs:	Neurotrofinas
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ON:	Óxido nítrico
PAI-1:	inhibidor del activador del plasminógeno-1
pCr:	Proteína C reactiva
PI3K:	fosfatidilinositol-3-cinasa
PKB:	proteína cinasa B
PRO-NT:	Proneurotrofinas
RI:	Resistencia a la insulina
SIA:	Ácido siálico
SM:	Síndrome metabólico
SNAP25:	proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa
SNARE:	proteína de fijación soluble de NSF
SNC:	Sistema nervioso central
TeTx:	Neurotoxina tetánica
TGs:	Triglicéridos
TLR:	Toll-like receptor
TNF α :	Factor de necrosis tumoral alfa
Trks:	Receptores tirosina-quinasa
Tyr:	Tirosina
VAMP:	Proteína de membrana asociada a vesículas
VLDL:	Very low density lipoprotein / Lipoproteína de muy baja densidad
Zn ²⁺ :	Zinc

1. Antecedentes generales

1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles

1.1.1. Epidemiología actual a nivel mundial y nacional

Las enfermedades no transmisibles, también conocidas como enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) (Córdova-Villalobos J.A., et al; 2008), son un grupo heterogéneo de padecimientos (Córdova-Villalobos J.A., et al; 2008) que tienden a ser de larga duración y resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales (OMS, 2018). Durante estos años se ha observado una “transición de riesgos”, ya que, durante la primera mitad del siglo XX, la población estaba expuesta a los riesgos propios de un país con desarrollo social e infraestructura incipiente, que se fueron modificando con el desarrollo y la urbanización (Barba Evia J.R; 2018). Esto trajo como consecuencia cambios en los estilos de vida y el surgimiento de exposición a “otros tipos de riesgo”, que se constituyen como los principales factores responsables de enfermedad; entre ellos: el estrés, tabaquismo, consumo de alcohol, hipertensión arterial sistémica (HAS), sedentarismo, patrón alimentario diferente compuesto por alimentos de alta densidad energética, sobrepeso, obesidad, hiperglucemia, dislipidemia (Barba Evia J.R; 2018; OMS, 2018), entre otros.

Los cuatro tipos de ECNT principales son: las enfermedades cardiovasculares (ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares), cáncer, enfermedades respiratorias crónicas (como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma) y diabetes (OMS, 2018).

Actualmente, las ECNT se consideran uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud debido a diversos factores como: el gran número de casos afectados, su creciente contribución a la mortalidad general, la aparición en edades cada vez más tempranas, el hecho de que son la causa más frecuente de incapacidad prematura y la complejidad y costo elevado de su tratamiento (Córdova-Villalobos J.A., et al; 2008; Barba Evia J.R; 2018). Con base a cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECNT son las responsables de la

muerte de 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen a nivel global. Aunque las ECNT se suelen asociar a los grupos de edad más avanzada, los datos estadísticos muestran que 15 millones de todas las muertes anuales atribuidas a las ECNT se producen entre los 30 y 69 años; y más del 85% de estas muertes “prematuras” ocurren en países de ingresos bajos y medianos (OMS, 2018).

1.1.2. Las ECNT durante el proceso de envejecimiento

La población mundial está envejeciendo rápidamente (Wahl, D., et al; 2019) y la tasa de crecimiento de la población de 60 años o más es aproximadamente tres veces más rápida en los países menos desarrollados que en los países más desarrollados (Kämpfen, F., et al; 2018). En México, la distribución de edad de la población en 1970 era piramidal; es decir, presentaba una base amplia porque 50% de la población era menor de 15 años y tenía una cúspide angosta. Para el año 2000, la pirámide se abultó en el centro debido al aumento de las personas en edades medias y la disminución de los menores de cinco años (Barba Evia J.R; 2018). Para el año 2050, debido a la reducción de las tasas de natalidad y el incremento de la esperanza de vida, se prevé una mayor proporción de población senecta (Barba Evia J.R; 2018). Lo anterior, toma relevancia debido a que el envejecimiento es el mayor factor de riesgo para la mayoría de las enfermedades crónicas: cardiovasculares, cánceres, osteoporosis, artritis, diabetes mellitus y trastornos neurodegenerativos como demencia (Wahl, D., et al; 2019).

Lo anterior, se relaciona con los cambios en el estilo de vida de las personas (Chiaranai, C; 2018) como un alto consumo de grasas saturadas, sedentarismo, disminución en la interacción social, hábito tabáquico o consumo de alcohol, entre otros (Wahl, D., et al; 2019). Además, está demostrado que el impacto de las ECNT en el estado funcional es mayor en los pacientes de edad avanzada (Durán, A., et al.; 2010), generando así un efecto negativo en su calidad de vida (Chiaranai, C; 2018). Esto último sustentado por el hecho de que experimentan una vida restringida, viven en aislamiento social, viven con incertidumbre y tienen que depender de otros (Chiaranai, C; 2018). Asimismo, son comunes las fallas de la

memoria, la actividad intelectual se vuelve más lenta, y disminuye la capacidad de atención, de razonamiento lógico y de cálculo en algunos adultos mayores; estas situaciones, sumadas a las enfermedades crónicas, hacen que el adulto mayor sea incapaz de desarrollar plenamente su autonomía (Durán, A., et al.; 2010).

Por lo tanto, es necesario realizar modificaciones en el estilo de vida ya que éstas podrían influir directamente en reducir la carga de enfermedades asociadas con la edad, incluida la demencia que es una condición neurodegenerativa progresiva que afecta o influye en una variedad de dominios cognitivos como la memoria, pensamiento, aprendizaje, comprensión, toma de decisiones y comportamiento que generan un deterioro importante en la función de las personas (Wahl, D., et al; 2019).

1.2. Síndrome metabólico

1.2.1. Concepto del “Síndrome metabólico”

El concepto de síndrome metabólico (SM) existe desde hace al menos 80 años. Eskil Kylin, un médico sueco, lo describió por primera vez en 1923 como la agrupación de hipertensión, hiperglucemia y gota. Más tarde, en 1947, el médico francés Jean Vague llamó la atención debido a que gracias a sus estudios concluyó que la adiposidad abdominal superior (denominada como “obesidad androide” o de tipo masculino) era el fenotipo de obesidad que se asociaba comúnmente con la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (Oladejo, A. O.; 2011).

Actualmente, el síndrome metabólico se define como la concurrencia de factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad que incluyen obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, disminución del colesterol HDL y/o hipertensión (Tune, J. D., et al; 2017).

1.2.2. Síndrome metabólico como problema de salud pública

Durante las últimas décadas, la prevalencia del síndrome metabólico ha aumentado notablemente en todo el mundo. Se estima que el 25% de la población mundial tiene

síndrome metabólico, aunque esta estimación varía ampliamente debido a la edad, etnia y género de la población estudiada (Syed, M.A., et al.; 2020).

Es necesario enfatizar que dos situaciones son las más importantes en la propagación de esta enfermedad: el aumento del consumo de comida rápida alta en calorías y baja en fibra; y la disminución de la actividad física debido a los transportes mecanizados y la forma sedentaria de actividades de tiempo libre (Saklayen, M. G.; 2018).

Con respecto a dos de los componentes del síndrome metabólico y la situación actual en México, los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT 2018), reportaron que la población mayor a 20 años correspondía al 65.4% del tamaño de la muestra (126.5 millones de habitantes); y de este porcentaje, se obtuvo que 76.8% de las mujeres padecía sobrepeso u obesidad (36.6% y 40.2%, respectivamente) mientras que 73% de los hombres padecía sobrepeso u obesidad (42.5% y 30.5%, respectivamente) (INEGI, INSP, Secretaría de Salud; 2018). Cabe mencionar que con respecto a la ENSANUT 2012 hubo un incremento en el número total de las personas diagnosticadas con diabetes, siendo en 2012 un total de 6.4 millones de personas y en 2018 un total de 8.6 millones de personas (INEGI, INSP, Secretaría de Salud; 2018).

1.2.3. Fisiopatología del síndrome metabólico: De lo molecular a lo clínico

Como se mencionó anteriormente, el SM se conceptualizó en base a una constelación de factores de riesgo, como glucosa plasmática en ayuno elevada, dislipidemia aterogénica, presión arterial elevada y obesidad abdominal, en individuos susceptibles a enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (Lee, MK., Han, K., Kim, M.K. et al.; 2020).

En este apartado se dará una breve explicación de la fisiopatología de los componentes del síndrome metabólico y sus efectos deletéreos a nivel del SNC como estrés del retículo endoplásmico en neuronas y trastornos cognitivos (Díaz, A., et al.; 2018).

1. Obesidad central (abdominal)

Existe evidencia que sugiere que el SM y la enfermedad cardiovascular podrían ser consecuencia de un proceso inflamatorio sistémico; para esto uno de los primeros mecanismos implicados en el inicio de la inflamación sistémica de bajo grado (ISBG) que caracteriza a las personas con obesidad es la inflamación en el tejido adiposo blanco o visceral (León-Pedroza JI., et al.; 2015). Es importante mencionar que los depósitos de grasa visceral contribuyen a la resistencia a la insulina más que la grasa subcutánea, ya que la lipólisis visceral conduce a un mayor suministro de ácidos grasos libres (AGL) al hígado a través de la circulación esplácnica (Rochlani, Y., et al.; 2017).

Este proceso de ISBG se diferencia de una respuesta inflamatoria clásica debido a que su duración es crónica, su localización es preferencialmente tejido insulino dependiente (como el tejido hepático y muscular), la infiltración celular que se presenta es especialmente de macrófagos y linfocitos T; hay una elevación en los niveles circulantes de proteínas de fase aguda y citocinas con actividad inflamatoria tales como proteína C reactiva (pCr), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y las interleucinas 1 β , 6 y 17; además, se ha reportado que otra característica importante de la ISBG es que no induce lesión en el tejido inmunológicamente infiltrado, es decir, éste no muestra alteraciones estructurales o pérdida en sus funciones primarias (León-Pedroza JI., et al.; 2015). Por otra parte, la ISBG por poseer una estrecha relación con el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas en el paciente con obesidad también ha recibido el nombre de metainflamación o inflamación metabólica (León-Pedroza JI., et al.; 2015).

Dentro de los efectos deletéreos más relevantes de la obesidad visceral es que causa una disminución de la captación de glucosa dependiente de insulina por lo que está claramente relacionada con el desarrollo de la resistencia a la insulina (Huang, P. L.; 2009). Esto probablemente se deba a la liberación de adipocinas tales como: TNF α e IL-6; las cuales tienen actividad proinflamatoria y contribuyen a la resistencia a la insulina y disfunción vascular (Huang, P. L.; 2009). La Tabla 1-1 resume las implicaciones que tienen algunas adipocinas (sustancias liberadas por

el tejido adiposo) en la fisiopatología de la resistencia a la insulina (RI) y al desarrollo del SM y sus complicaciones.

Adipocinas	Rol en la fisiopatología de la RI y síndrome metabólico
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la producción de reactantes de fase aguda en el hígado, incluida la PCR. • Aumenta los niveles de fibrinógeno dando como resultado un estado protrombótico. • Promueve la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales y la activación de las vías RAS locales. • Disminuye la expresión de adiponectina.
TNF α	<ul style="list-style-type: none"> • Provoca fosforilación e inactivación de los receptores de insulina en el tejido adiposo • Aumenta el proceso de lipólisis y por ende; la cantidad de AGL. • Aumenta la secreción de interleucina- (IL-) 1β e IL-6, lo que disminuye la secreción de adiponectina. • Inhibe la vía de señalización del IRS-1. • Disminuye la expresión de adiponectina.
Leptina	<ul style="list-style-type: none"> • Gracias a un transporte específico y saturable atraviesa la BHE, y a nivel cerebral refleja el grado de adiposidad de un organismo. Además, es una adipocina involucrada en el mantenimiento de la homeostasis energética debido a su efecto anorexigénico en neuronas del núcleo arcuato.
PAI-1	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe al activador del plasminógeno tisular y, por lo tanto, se considera un marcador de alteración de la fibrinólisis y aterotrombosis; por lo tanto, aumenta el riesgo de resultados cardiovasculares adversos.
AGL	<ul style="list-style-type: none"> • Se unen a TLR-1, 2 y 6 localizados en la superficie de macrófagos, formando heterodímeros que unen lipopéptidos di- o triacilados e induciendo la liberación de citocinas inflamatorias. • Aumentan el riesgo de aterogénesis y a su vez, el cardiovascular. • El exceso de AGL exacerba procesos oxidativos (lipoperoxidación) que conlleva a un escenario de estrés oxidativo celular = \uparrow ERO y \uparrowERN.
Adiponectina	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto protector: Regula el metabolismo de lípidos y glucosa, aumenta la sensibilidad a la insulina, regula la ingesta de alimentos y el peso corporal, protege contra una inflamación crónica; Inhibe las enzimas gluconeogénicas hepáticas y la tasa de producción de glucosa endógena en el hígado. Tiene acción antiaterogénica que incluye una inhibición de la activación endotelial. • Su expresión se ve disminuida por: TNFα e IL-6.

Tabla 1-1 Adipocinas y su rol en la fisiopatología de la resistencia a la insulina (RI) y síndrome metabólico.

PCR: Proteína C reactiva, TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa, PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1, AGL: Ácidos grasos libres, IRS-1: Sustrato 1 del receptor de insulina, BHE: Barrera hematoencefálica, TLR: Toll-like receptor, ERO: Especies reactivas de oxígeno, ERN: Especies reactivas de Nitrógeno. (Referencias utilizadas para su elaboración: Huang, P. L.; 2009; Kaur, J.; 2014; Rochlani, Y., et al.; 2017; Díaz, A., et al; 2018; Izquierdo, A. G., et al; 2019).

En la práctica clínica, se consideran indicadores indirectos de adiposidad el índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura e índice cintura – cadera (ICC). El IMC se calcula con la fórmula: peso [kg]/ estatura [m²]. En la Tabla 1-2, se muestran los valores de referencia para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en la población mexicana con base a lo establecido en la “NOM-008-SSA3-2017, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad” (Secretaría de Salud, 2016; Secretaría de Gobernación, 2018). En cuanto a la medición de la circunferencia de cintura, esta tiene por objetivo el detectar a la población en riesgo de padecer ECNT, para ello la Secretaría de Salud de México ha establecido los siguientes indicadores de referencia: >80 cm en mujeres y >90 cm en hombres (Secretaría de Salud; 2016).

Estos valores de referencia específicos de la población mexicana, como se mencionará más adelante, son necesarios para el diagnóstico del SM con base a las especificaciones de los criterios elaborados por la Federación Internacional de Diabetes (IDF), Asociación Americana del Corazón (AHA, por sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre en 2009; en donde para el diagnóstico de obesidad, se exige que los indicadores/valores de referencia sean ajustados de acuerdo a la población en estudio.

Valores de referencia para diagnóstico de sobrepeso y obesidad en población mexicana	
Sobrepeso	Sin talla baja: 25.0 a 29.9 kg/m ² Talla baja: 23 a 24.9 kg/m ²
Obesidad	Sin talla baja: ≥ 30 kg/m ² Talla baja: ≥ 25 kg/m ² Obesidad mórbida (Clase III): ≥ 40 kg/m ²

Tabla 1-2 Valores de referencia para diagnóstico de sobrepeso y obesidad en población mexicana

Se entiende como talla baja aquella que es menor a 1.60 metros en el varón adulto y menor a 1.50 metros en la mujer adulta (Secretaría de Gobernación, 2018).

2. Hiperglucemia y resistencia a la insulina

La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos (Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017) y 6,000 kDa (Neumann K, et al.; 2008) que es producido y secretado por las células β de los islotes pancreáticos (Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017). Ésta inicia sus acciones biológicas a nivel periférico al unirse a su receptor, una glucoproteína de membrana que pertenece a la familia de receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas (Tyr) y que además está formado por 2 subunidades α y 2 subunidades β , como se muestra en la Figura 1-1 (Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017). La unión de la insulina a la subunidad α de su receptor genera cambios conformacionales que inducen a su activación catalítica y la autofosforilación de varios residuos de Tyr localizados en la región citosólica de la subunidad β (Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017). Los residuos autofosforilados son entonces reconocidos por diferentes proteínas adaptadoras como las de la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS), de los cuales IRS-1 e IRS-2 constituyen los dos principales sustratos e intermediarios más comunes en la etapa inicial de la

propagación de la señal de la insulina río abajo. Las dos vías principales de señalización de la insulina son: la vía fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/Akt) también llamada proteína cinasa B (PKB); y la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras, cuyas acciones metabólicas se resumen en la Figura 1-1 (Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017).

Dentro de las principales acciones biológicas de la insulina a nivel periférico destacan: la captación, utilización y almacenamiento de nutrientes celulares; aumentando así la captación de glucosa, principalmente en músculo y tejido adiposo, en donde promueve su conversión a glucógeno y triglicéridos, respectivamente (Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017). Además, en el hígado inhibe la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la cetogénesis (Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017); y en el tejido adiposo inhibe la lipólisis (Huang, P.L., 2009).

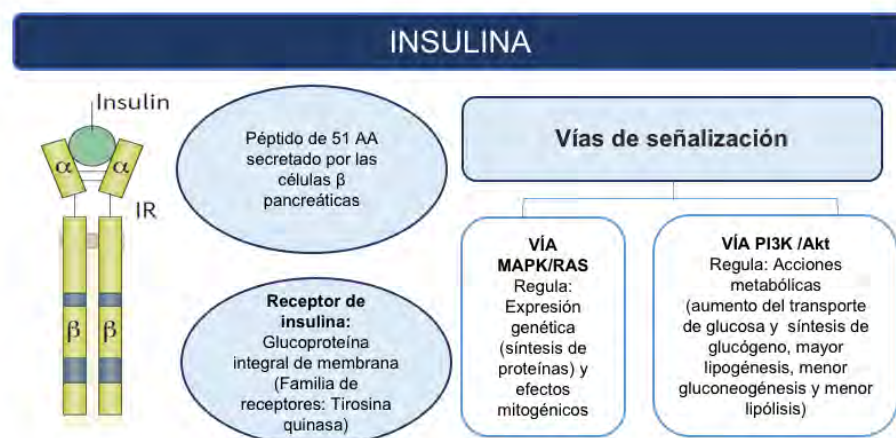


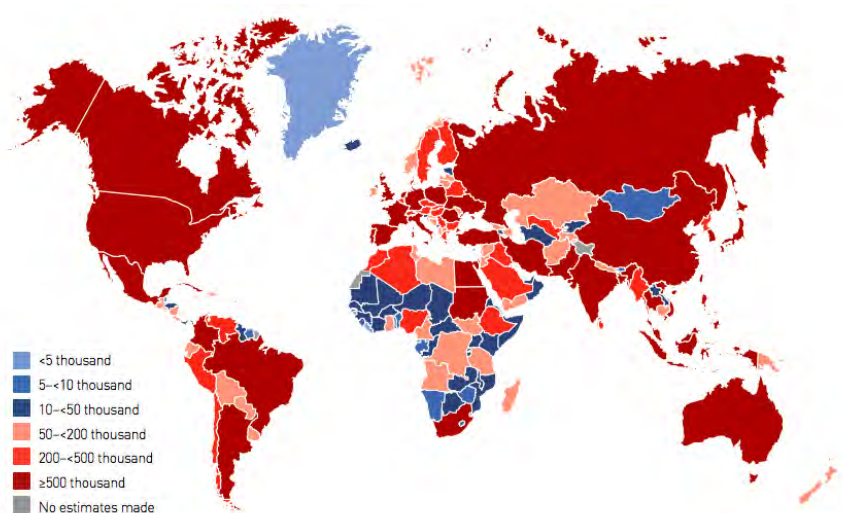
Figura 1-1 Generalidades de la insulina, su receptor y vías de señalización

La insulina es un péptido de 51 aminoácidos, sus actividades biológicas se inician cuando se une con su receptor, una glucoproteína de membrana que consiste en dos subunidades alfa y dos subunidades beta; la primera de 135 kDa que contiene el sitio de unión para la insulina. AA: aminoácidos, IR: insulín receptor (receptor de insulina). (Referencias utilizadas para su elaboración: Gutiérrez-Rodelo C, et al.; 2017; Arnold, S. E., et al; 2018).

En la actualidad y en nuestro medio, una de las ECNT con mayor prevalencia es la diabetes. En la diabetes tipo 2, la hiperglucemia es el resultado, inicialmente, de la incapacidad de las células del cuerpo para responder completamente a la insulina, una situación denominada "resistencia a la insulina" (RI) (IDF; 2019). Durante el estado de RI, la hormona es ineficaz y, a su debido tiempo, provoca un aumento en

la producción de insulina (hiperinsulinemia compensatoria). Esto finalmente puede conllevar a una producción inadecuada de la hormona como resultado de la falla de las células beta pancreáticas para satisfacer la demanda.

Es importante mencionar que la diabetes tipo 2 se observa con mayor frecuencia en adultos mayores debido al estilo de vida caracterizado por inactividad física y una dieta inadecuada (IDF; 2019). En el Mapa 1-1, se visualiza la importante distribución a nivel global de personas mayores de 65 años con diagnóstico de diabetes (IDF; 2019). Este grupo de la población es de gran interés porque la edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la demencia, donde la Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común. Por otro lado, existe evidencia de que la presencia de ECNT como la diabetes aunado a la edad avanzada, incrementan aún más el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas (Rojas-Gutierrez E., et al; 2017).



Mapa 1-1 Número de personas mayores de 65 años con diabetes en 2019

(Tomado de: International Diabetes Federation - DIABETES ATLAS, 9na edición)

Retomando la importancia de la insulina como hormona reguladora, ésta también juega un papel clave a nivel de SNC y sus funciones biológicas normales a este nivel pueden verse alteradas en individuos que desarrollan resistencia periférica a la insulina. La insulina tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) gracias a un proceso de transporte saturable y regulado por receptores de

insulina (Neumann K, et al.; 2008). Además, se ha reportado que sus receptores están más concentrados en las neuronas (especialmente densidades postsinápticas) en comparación con las células gliales (Kim, B., & Feldman, E. L.;2012). Sin embargo, las áreas con mayor densidad de receptores de insulina son: bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza cerebral, cerebelo e hipocampo (Neumann K, et al.; 2008).

El estudio de algunas de las acciones de la insulina a nivel de SNC como su contribución en procesos de aprendizaje y memoria a través de la modulación de la plasticidad sináptica, neurogénesis, promoción de la supervivencia neuronal, entre otras; son de gran interés debido a que se ha demostrado a través de experimentos realizados en ratas con síndrome metabólico que éstas desarrollan alteraciones electrofisiológicas como disminución de la amplitud de la potenciación a largo plazo de las células hipocampales, afectando así procesos de aprendizaje y memoria (Treviño, S., et al; 2017). En cuanto a los procesos de plasticidad sináptica, éstos se detallarán más adelante.

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, en este apartado es de suma importancia mencionar algunas de las acciones biológicas de la insulina a nivel del SNC, cómo se ven afectadas en pacientes que desarrollan resistencia periférica a la insulina y las consecuencias que esto conlleva en los procesos de memoria y aprendizaje. Ésta información se resume en la Figura 1-2

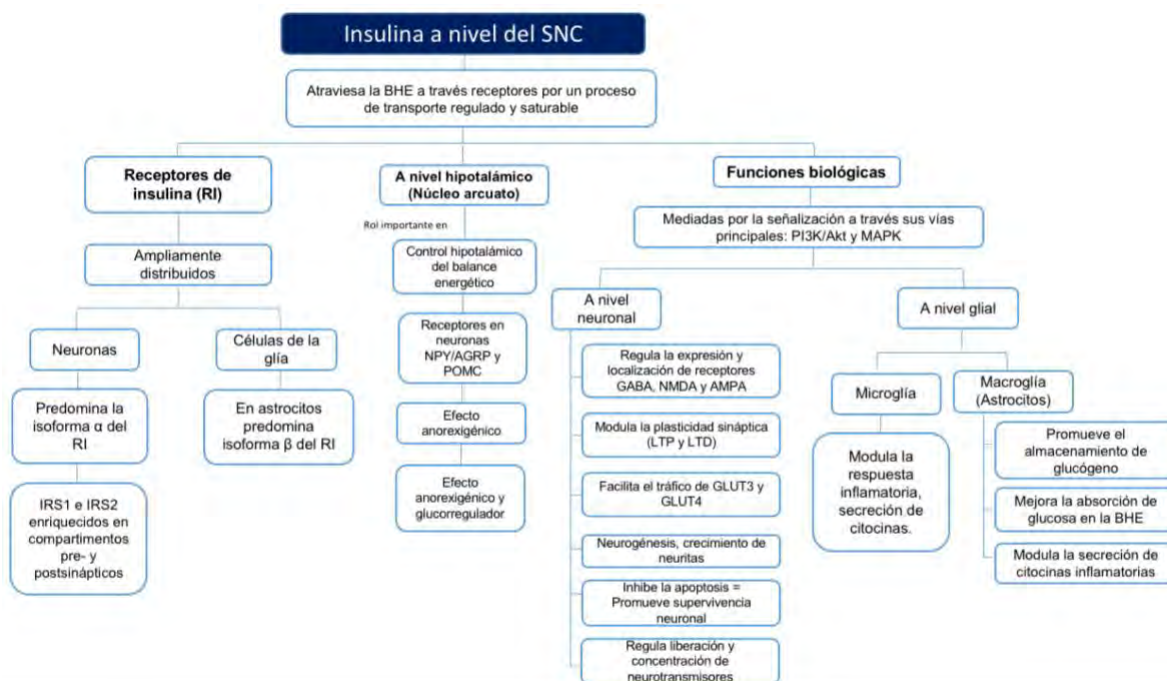


Figura 1-2 Insulina a nivel del SNC

RI: Resistencia a la insulina, IRS: Sustrato del receptor de insulina, NPY/AGRP: Neuropéptido Y/Proteína relacionada con agouti, POMC: Proopiomelanocortina, GABA: Ácido γ -aminobutírico, NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico, AMPA: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico, GLUT: Transportador de glucosa, BHE: Barrera hematoencefálica (Información obtenida de: Neumann K, et al.; 2008, Treviño, S., et al; 2015, Timper K, Bruñing JC.; 2017, Arnold S, et al.;2018, Kellar D. et al; 2020)

En nuestros días, existen estudios en humanos y modelos animales que sugieren que las alteraciones metabólicas inducidas por el síndrome metabólico están relacionadas con un deterioro de la memoria; esto puede ser el resultado de alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Treviño, S. et al; 2017).

A nivel cerebral, se entiende por resistencia a la insulina a la incapacidad de las células cerebrales para responder a esta hormona como lo harían normalmente, lo que resulta en alteraciones en las funciones de respuesta sináptica, metabólica e inmunitaria (Arnold S, et al.; 2018). Gracias a estudios en modelos animales con alteración en el metabolismo de la glucosa (condiciones de hiperglucemia), se ha demostrado la presencia de degeneración sináptica a través de la disminución de marcadores sinápticos (Treviño, S. et al; 2017). Además de la pérdida sináptica, se ha evidenciado la presencia de astrogliosis reactiva (Treviño, S. et al; 2017), serie de cambios en astrocitos (macroglía) que ocurren a nivel molecular, celular y

funcional como respuesta a daños y enfermedades del SNC de distinto grado (Guillamón-Vivancos T, et al.; 2013). Estos cambios y/o alteraciones en conjunto alteran la estructura y viabilidad de las neuronas lo que a su vez se relaciona con el deterioro de la memoria. Por lo tanto, cuando hay alteraciones en el metabolismo de la glucosa, esto puede causar modificaciones en los procesos de plasticidad, dando lugar a la muerte neuronal (Treviño, S. et al; 2017).

3. Dislipidemia aterogénica e hipertensión arterial sistémica (HAS)

En situaciones normales o sin patología, en el tejido adiposo, la insulina inhibe la lipólisis y estimula la captación de glucosa (Huang, P. L., 2009). Sin embargo, en procesos patológicos como la resistencia a la insulina, donde hay una alteración de la señalización de esta hormona, la lipólisis no es regulada (inhibida) generando así niveles elevados de ácidos grasos libres (AGL) (Huang, P. L., 2009).

En el hígado, los AGL sirven como sustrato para la formación de triglicéridos (TGs), además influyen en la producción de apolipoproteína B (ApoB) que es el principal constituyente para la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL). En situaciones normales, la insulina degrada la apoB a través de vías dependientes de PI3K y regula la actividad de la enzima lipoproteína lipasa útil para el aclaramiento de VLDL, pero en la resistencia a la insulina ambos procesos se ven alterados (Huang, P. L., 2009). Por lo tanto, las características principales de la dislipidemia aterogénica son: niveles altos de triglicéridos, niveles bajos de colesterol de alta densidad (HDL) y un aumento de LDL (Huang, P. L., 2009).

Todos estos procesos conllevan a un incremento de la lipoperoxidación, disminución de sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa y catalasa, disfunción mitocondrial, entre otras alteraciones celular; ocasionando así un metabolismo oxidativo incrementado que es capaz de ejercer efectos deletéreos no solo a nivel periférico sino a nivel central, generando daño y muerte neuronal (Rojas-Gutierrez E. et al.; 2017). De igual forma, es importante mencionar que existe

evidencia de la relación entre la hiperlipidemia y el incremento del riesgo de desarrollar demencia (Treviño, S. et al; 2015).

Por último, la disfunción endotelial es la vía final común entre muchos factores de riesgo cardiovascular y el desarrollo de aterosclerosis. En situaciones normales, las funciones del endotelio son: detectar y responder ante estímulos fisiológicos y patológicos produciendo sustancias vasoactivas, como el óxido nítrico (ON), prostaciclina y endotelinas. Por lo tanto, la expresión endotelial de las moléculas de adhesión celular gobierna las interacciones con los leucocitos y monocitos circulantes, afectando la inflamación; y con las plaquetas circulantes, afectando la hemostasia y la trombosis. El endotelio también modula la respuesta de la capa de músculo liso vascular, lo que puede contribuir a la formación de la íntima durante el desarrollo de placas ateroscleróticas. Sin embargo, la disfunción endotelial ocurre cuando el endotelio no cumple con sus mecanismos fisiológicos y protectores normales. Esto último puede deberse al daño generado por: el estrés oxidativo, hiperglucemia, productos de glicación avanzada, AGL, citocinas inflamatorias o adipocinas (Huang, P. L., 2009) presentes en las ECNT como la diabetes.

1.2.4. Criterios diagnósticos

La primera definición formalizada del síndrome metabólico fue propuesta en 1998 por la OMS, sin embargo, la definición más reciente data del año 2009. Esta última fue propuesta por la Federación Internacional de Diabetes (IDF), Asociación Americana del Corazón (AHA, por sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (AHA/NHLBI, por sus siglas en inglés) (Alberti, K. G. M. M., et al; 2009, Aguilar-Salinas, C. A., Viveros-Ruiz, T.; 2019). (Tabla 1-3)

Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico (AHA/NHLBI + IDF, 2009)	
Se requieren 3 de los siguientes componentes:	
Obesidad	Circunferencia de cintura elevada (Definiciones específicas de cada población y país)
Elevación de triglicéridos	≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) o en tratamiento
Disminución de HDL	Hombres: < 40 mg/dL (1.0 mmol/L) Mujeres: < 50 mg/dL (1.3 mmol/L) O tratamiento específico para alteración lipídica
Hipertensión	TAS: ≥130 y TAD: ≥85 mmHg O tratamiento para hipertensión arterial sistémica
Hiperglicemia	Glucosa en ayuno > 100 mg/dl o en tratamiento específico para hiperglicemia

Tabla 1-3 Criterios diagnósticos para síndrome metabólico

Se requieren 3 de los 5 componentes para realizar el diagnóstico. TAS: Tensión arterial sistólica, TAD: Tensión arterial diastólica. (Elaborada con información de: Alberti, K. G. M. M., et al; 2009, Aguilar-Salinas, C. A., Viveros-Ruiz, T.; 2019)

1.3. Hipocampo

1.3.1. Anatomía del hipocampo

El hipocampo o formación hipocampal es un complejo cortical filogenéticamente primitivo, deriva de la región medial del telencéfalo (Olivares Hernández JD, et al.; 2015) y está localizado a nivel del lóbulo temporal medial en los humanos o en la porción caudal del prosencéfalo de los roedores; esta estructura llamó por primera vez la atención de los científicos por su organización laminar ordenada y arquitectónicamente simple. Sin embargo, fue hasta finales del siglo XIX que el Dr. Santiago Ramón y Cajal proporcionó dibujos sorprendentemente detallados de la organización microscópica de esta estructura (Spencer R, Bland S.; 2019). Estudios posteriores han utilizado diferentes técnicas bioquímicas y de rastreo axonal que han permitido conocer a más detalle la citoarquitectura y las conexiones de la formación hipocampal, convirtiéndola en una de las estructuras más estudiadas y mejor conocidas del cerebro (Xiong, H.; 2008).

El hipocampo está conformado por: el cuerno de Amón (CA) o hipocampo propiamente dicho; giro dentado (GD) (también conocido como circunvolución dentada), complejo subicular (subdividido en: presubiculum, subiculum y

parasubiculum) y corteza entorrinal (CE) (Olivares Hernández JD, et al.; 2015, Spencer R, Bland S.; 2019), como se muestra en la Figura 1-3. El hipocampo propiamente dicho es un pliegue de corteza en forma de “U” compuesto por las regiones CA1, CA2 y CA3; y el GD es una corteza de tres capas doblada que forma una tapa sobre el borde libre del CA (Cuerno de Amón o Cornu Amonis). (Xiong, H.; 2008).

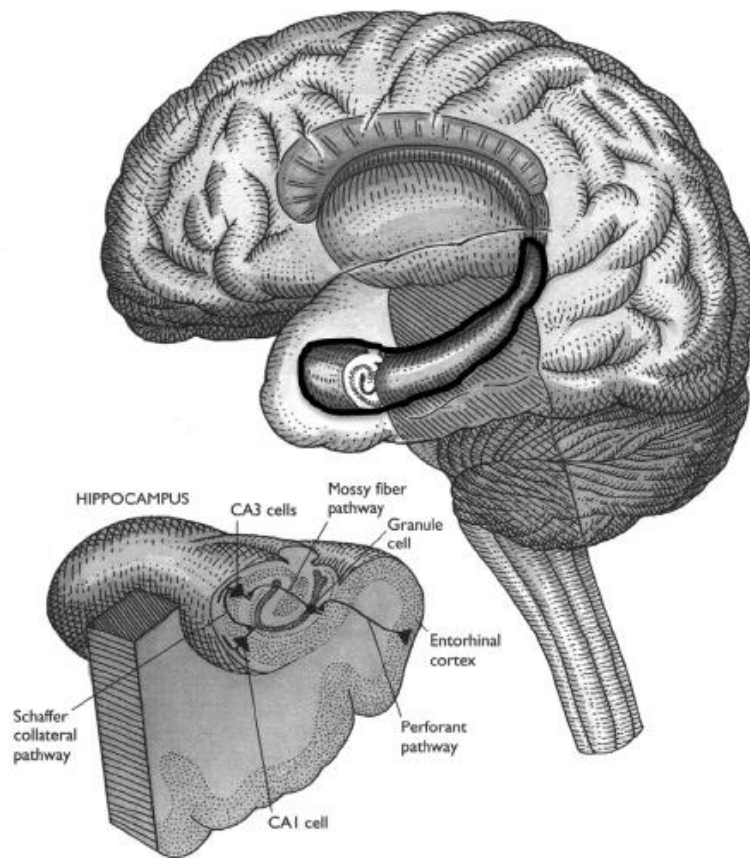


Figura 1-3 Anatomía del hipocampo

La formación hipocámpal consta de: el giro o circunvolución dentada, el complejo subicular y el hipocampo propiamente dicho que desde el punto de vista fisiológico ha sido dividido en tres zonas, en sentido lateral medial: CA1, CA2 y CA3 (CA son las iniciales de Cornu Amonis, uno de los antiguos nombres del hipocampo). (Imagen tomada de: Spencer R, Bland S.; 2019. Información tomada de: Aguirre Siancas, E.; 2015).

La organización laminar del hipocampo se puede visualizar fácilmente al examinar microscópicamente una sección transversal de éste como se muestra en la Figura 1-4 (Spencer R, Bland S.; 2019). De esta organización, es importante destacar que las dendritas apicales de las neuronas piramidales se extienden hacia el stratum

radiatum y las dendritas basales hacia el stratum oriens del hipocampo (Spencer R, Bland S.; 2019). La capa molecular contiene las dendritas de las células granulares del GD, que típicamente muestran un campo dendrítico de forma cónica (Xiong, H.; 2008). Como se mencionará más adelante, las células granulares dan lugar a axones amielínicos denominados fibras musgosas; la mayoría de éstas se proyectan al estrato lúcido de la región CA3 donde terminan en las dendritas apicales proximales de las células piramidales de esta región (Xiong, H.; 2008).

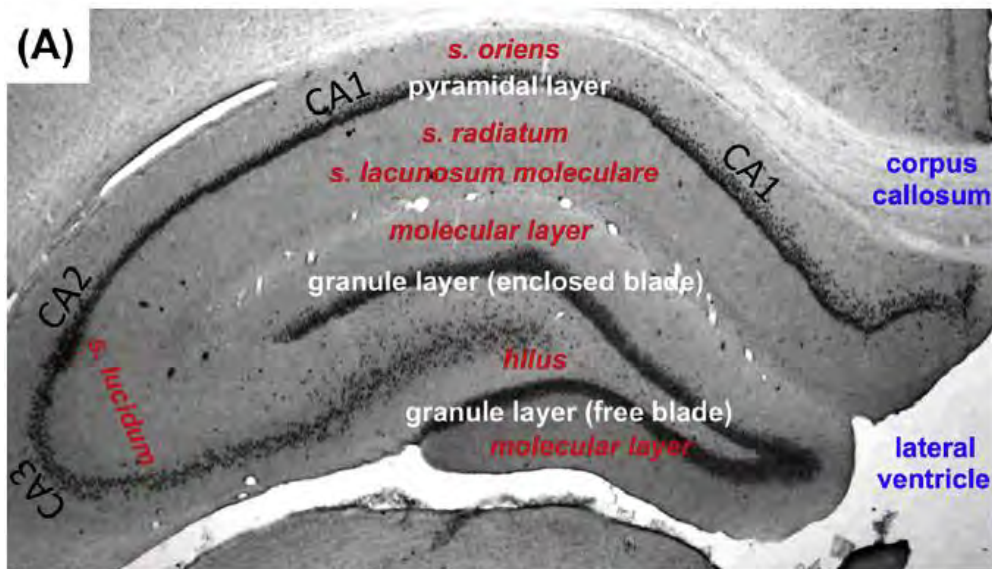


Figura 1-4 Organización laminar del hipocampo
(Imagen tomada de: Spencer R, Bland S.; 2019)

Otro punto por destacar de la anatomía del hipocampo es que se pueden distinguir dos porciones: ventral o anterior y dorsal o posterior (Gulyaeva, N. V.; 2018). La primera al estar mucho más vinculada a estructuras subcorticales como la amígdala y el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (Lee, A. R, et al.; 2017), se distingue por su involucro en el comportamiento emocional (ejemplo, en la ansiedad) y la regulación de dicho eje; mientras que la porción dorsal al recibir información sensorial polimodal de áreas corticales (Lee, A. R, et al.; 2017), está involucrada en procesos de aprendizaje y memoria sobretodo asociados con la navegación espacial (Lee, A. R, et al.; 2017, Gulyaeva, N. V., 2018). La memoria espacial consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y

recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Olivares Hernández JD, et al.; 2015).

En las investigaciones clínicas y traslacionales, el hipocampo dorsal es de interés principal en los estudios de neurodegeneración y demencia, mientras que una estrecha asociación del hipocampo ventral con la respuesta al estrés, el trastorno depresivo y otros trastornos mentales es la principal razón para su estudio (Gulyaeva, N. V.; 2018).

1.3.2. Morfología y función de las neuronas hipocampales

Los microcircuitos corticales, incluido el hipocampo, son unidades de procesamiento críticas que dan lugar a las funciones cognitivas del cerebro de los mamíferos (Booker, S. A., Vida, I.; 2018). A nivel del hipocampo se pueden distinguir dos clases neuronales principales: células principales de carácter excitatorio (piramidales y granulares) e interneuronas de carácter inhibitorio, que liberan los neurotransmisores glutamato y GABA, respectivamente (Booker, S. A., Vida, I.; 2018, Spencer R, Bland S.; 2019).

En relación con su morfología, las neuronas piramidales se caracterizan por un cuerpo celular o soma en forma "piramidal" o de "lágrima" que varía en diámetro entre las regiones del hipocampo propiamente dicho, como se muestra en la Figura 1-5. En la región CA1, el cuerpo celular de este tipo de neuronas cuenta con un diámetro aproximado de 15 μm , mientras que el de las regiones CA2 y CA3 es aproximadamente de 25 μm (Spencer R, Bland S.; 2019). Otro punto por destacar es que a partir del ápice y la base de las células piramidales emergen árboles dendríticos de múltiples ramas que por su origen se denominan dendritas apicales y basales, respectivamente. En cuanto a la función de las neuronas piramidales, se les atribuye el nombre de "células de lugar". Esto último debido a que estudios en ratas han demostrado que tras la exposición inicial a un nuevo entorno, estas células adquieren en varios minutos la capacidad de aumentar su tasa de activación neuronal cada vez que la rata regresa a un lugar particular en ese entorno, formando así un "mapa cognitivo" dentro del cerebro (Spencer R, Bland S.; 2019).

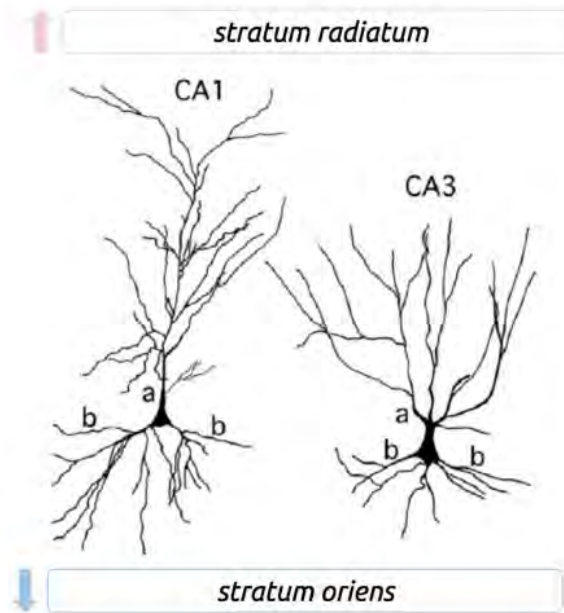


Figura 1-5 Neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3

En la imagen se muestran células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo; además, se señalan con las letras a y b las dendritas apicales y basales, respectivamente. Histológicamente, las dendritas apicales se extienden hasta el stratum radiatum del hipocampo, mientras que las basales lo hacen hacia el stratum oriens. (Imagen tomada y modificada de: Spencer R, Bland S.; 2019)

Por otro lado, el principal tipo celular a nivel del GD son las células granulares (Amaral, D. G., et al; 2007). Éstas tienen un cuerpo celular elíptico con un ancho de aproximadamente 10 μm y una altura de 18 μm ; además, sus dendritas apicales forman un árbol característico en forma de cono cuyas ramas se extienden a lo largo de la capa molecular del hipocampo (Figura 1-6) (Amaral, D. G., et al; 2007). Debido a que las dendritas emergen solo de la parte superior o apical del cuerpo celular, las células granulares se consideran neuronas monopolares.

Es importante mencionar que las células granulares dan lugar a axones amielínicos distintivos, a los que el Dr. Ramón y Cajal denominó fibras musgosas (Amaral, D. G., et al; 2007). Las fibras musgosas al originarse en la porción basal del cuerpo celular, se extienden hacia la capa de células polimórficas en el hilio, un área de transición entre el giro dentado y el hipocampo propiamente dicho; éstas además son glutaminérgicas (Xiong, H.; 2008).

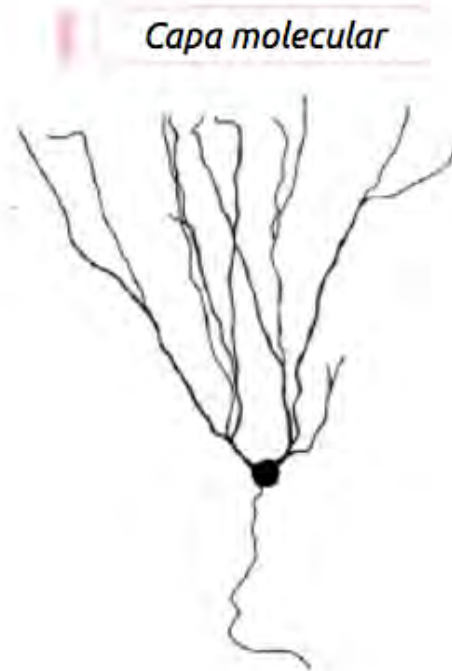


Figura 1-6 Célula granular del GD

En la imagen se muestra la forma de cono característica del árbol dendrítico de la célula granular, y su cuerpo celular elíptico u ovoide. (Imagen tomada y modificada de: Spencer R, Bland S.; 2019)

1.3.3. Circuito trisináptico

Actualmente, existe evidencia acumulada sobre el importante papel de la formación hipocampal en la adquisición y recuperación de recuerdos episódicos y espaciales en mamíferos (Stepan, J., Dine, J., Eder, M.; 2015). Cabe mencionar que la memoria declarativa consiste en la memoria de eventos (memoria episódica) y hechos (memoria semántica) (Riedel, W. J., Blokland, A; 2015). El circuito del procesamiento de la información de la memoria declarativa es el llamado circuito trisináptico o vía excitatoria trisináptica (Olivares Hernández JD, et al.; 2015), cuya representación esquemática se muestra en la Figura 1-7. Este circuito está compuesto por: CE, GD y regiones CA1-CA3 del hipocampo propio (Olivares Hernández JD, et al.; 2015).

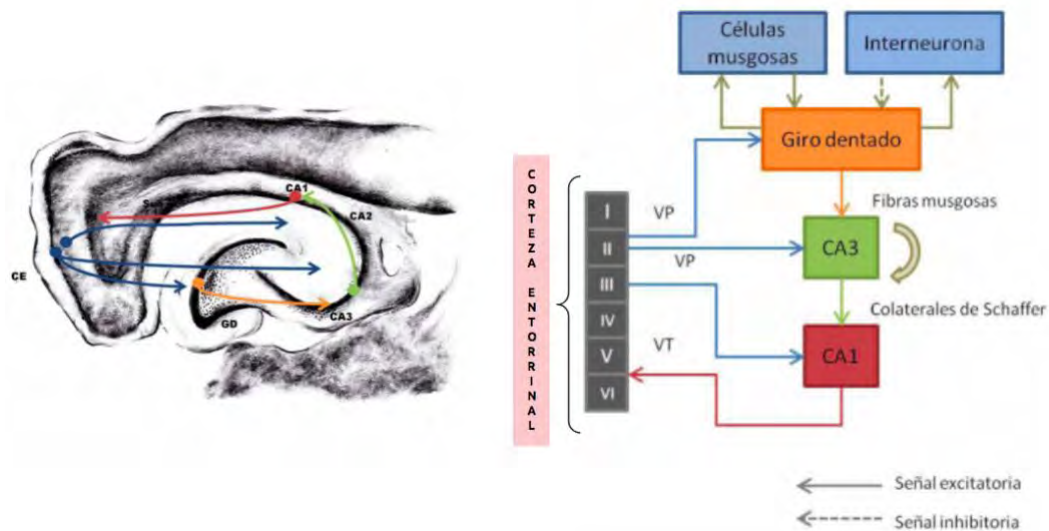


Figura 1-7 Esquema del circuito trisináptico

Este circuito inicia a nivel de las neuronas de las capas II y III de la corteza entorrinal, y finaliza cuando las neuronas piramidales de CA1 y subículo se proyectan hacia la capa V de la CE. Abreviaturas: VP (vía perforante), CE (corteza entorrinal), GD (giro dentado). (Imagen tomada de: Olivares Hernández JD, et al.; 2015. Información complementada con: Witter, M. P., Doan, T. P., Jacobsen, B., Nilssen, E. S., & Ohara, S.; 2017).

El circuito trisináptico inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal (CE) (Olivares Hernández JD, et al.; 2015), la cual es la conexión aferente más importante (Aguirre Siancas, E.; 2015). La CE, denominada como el área 28 de Brodman, se considera la interfaz principal de los circuitos cortico-hipocámpales (Witter, M. P., et al; 2017) y en los humanos se localiza en porción ventromedial del lóbulo temporal (Coutureau, E., Di Scala, G.; 2009). Las neuronas de las capas II y III de la CE envían sus proyecciones hacia las células granulares del giro dentado, a través de la vía perforante (Xiong, H.; 2008). En seguida, estas células proyectan de forma unidireccional sus axones (fibras musgosas) (Aguirre Siancas, E.; 2015) hacia las neuronas piramidales de la región CA3, las cuales finalmente envían sus axones hasta las neuronas piramidales de la región CA1 mediante los colaterales de Schaffer (Olivares Hernández JD, et al.; 2015). Por último, las principales vías eferentes de la formación hipocámpal se originan desde CA1 y el subículo finalizando en la CE, la cual tiene conexiones recíprocas con amplias áreas de asociación de la corteza cerebral como es la corteza prefrontal, incluyendo a la corteza orbitofrontal (Aguirre Siancas, E.; 2015).

La información procesada mediante este circuito trisináptico permite relacionar diferentes aferencias sensoriales pertenecientes a diversos estímulos gracias a que las células piramidales del hipocampo tienen un alto grado de interconexión, facilitando las relaciones entre las diferentes entradas de información (Olivares Hernández JD, et al.; 2015).

1.3.4. Rol del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria

El papel del hipocampo en el aprendizaje y la memoria ha sido el foco de los estudios de neurociencia desde que Scoville y Milner informaron el caso del paciente H.M. (Henry Molaison) quien debutó con amnesia anterógrada (incapacidad de formar nueva memoria) grave después de una resección bilateral del lóbulo temporal medial, incluyendo la ablación del hipocampo (Squire L. R.; 2009).

La suposición de que la información se almacena en el cerebro como cambios en la eficacia sináptica fue propuesta inicialmente por Ramón y Cajal y luego refinada por Donald Hebb (Xiong, H.; 2008). Sin embargo, esta suposición no se puso a prueba hasta principios de la década de 1970, cuando Timothy Bliss y Terje LØmo hicieron un descubrimiento importante de que una breve estimulación eléctrica de alta frecuencia de una vía excitadora del hipocampo producía una mejora duradera en la fuerza de las sinapsis estimuladas. Este efecto se conoce como potenciación a largo plazo (LTP). De éste se hablará en líneas posteriores.

En cuanto a la memoria, ésta se puede dividir en memoria de corto plazo (memoria de trabajo) y memoria de largo plazo. La memoria de corto plazo tiene una capacidad limitada y como su nombre indica, dura sólo por un período corto de tiempo. En cambio, la memoria de largo plazo puede almacenar grandes cantidades de información que potencialmente tienen duración ilimitada. La memoria de largo plazo se puede subclasificar en dos formas: memoria declarativa (episódica y semántica) y memoria no declarativa o implícita (Aguirre Siancas, E.; 2015). La memoria espacial se conceptualiza como un subtipo de memoria episódica; y es la responsable de reconocer, codificar, almacenar y recuperar la información acerca

de la disposición de los objetos, rutas específicas, configuraciones y localizaciones espaciales; lo que permite al organismo desenvolverse en un entorno (Aguirre Siancas, E.; 2015).

Por lo tanto, gracias a estudios a partir del caso H.M., se sabe que para la formación o la codificación de la memoria declarativa se requieren estructuras del lóbulo temporal, siendo el hipocampo una estructura clave en la formación de la memoria declarativa de largo plazo (Aguirre Siancas, E.; 2015).

Es importante recordar que para la formación de nueva memoria es necesario un proceso secuencial que involucra: la adquisición de nueva información (codificación), conservación de dichos conocimientos (almacenamiento o retención) y la posibilidad de traer nuevamente al presente la información almacenada (recuperación) (Aguirre Siancas, E.; 2015).

1.3.5. Potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD)

Se conoce como “plasticidad sináptica” al proceso por el cual las conexiones entre dos neuronas, o sinapsis, cambian de fuerza. Por definición, es un término funcional que se refiere a un aumento o disminución de la eficacia sináptica (Lu, Y., et al; 2008). Dado que se cree que los recuerdos se almacenan en las sinapsis, se considera que la plasticidad sináptica es el mecanismo celular para que los procesos de aprendizaje y memoria se lleven a cabo. Además, la potenciación a largo plazo en el hipocampo es la forma más estudiada de plasticidad sináptica (Lu, Y., et al; 2008).

La LTP se define como un aumento persistente en el tamaño de la respuesta sináptica evocada registrada a partir de células individuales o grupos de células (Xiong, H.; 2008). Es importante mencionar que la LTP está típicamente dividida en al menos 3 distintas y secuenciales fases: la potenciación de corta duración, la fase temprana de la potenciación a largo plazo (E-LTP) y la fase tardía de la potenciación a largo plazo (L-LTP); en las 2 primeras fases no se requiere de síntesis proteica ni transcripción génica; en cambio, la L-LTP involucra síntesis proteica y transcripción génica y tiene una duración que va de varias horas a días (Aguirre Siancas, E.;

2015, Lu, Y., et al; 2008). Además, la L-LTP está asociada con el crecimiento y remodelación en la densidad postsináptica, así como al aumento de las espinas sinápticas preexistentes dando como consecuencia formación de nuevas sinapsis (Aguirre Siancas, E.; 2015, Lu, Y., et al; 2008).

Por otro lado, el efecto de depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés), descubierto in vitro por primera vez en CA1, es una disminución de la eficacia sináptica dependiente de la actividad de larga duración (Leff, P., et al; 2002); y en conjunto con la LTP, son esenciales para los procesos de aprendizaje y memoria (Lüscher, C., & Malenka, R. C.; 2012) (Figura 1-8).

Cabe mencionar que aunque la LTP se demostró por primera vez en las sinapsis de la vía perforante en las células granulares del GD, la mayoría de los experimentos para comprender los mecanismos de la LTP se han realizado en las sinapsis de las colaterales de Schaffer (Xiong, H.; 2008) que se encuentran entre las neuronas presinápticas de CA3 y las neuronas postsinápticas de CA1 (Aguirre Siancas, E.; 2015). Además, se ha encontrado que el receptor para glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA), es crítico para que se lleve a cabo la potenciación a largo plazo (Aguirre Siancas, E.; 2015).

En el hipocampo, cuando las neuronas están en estado de reposo, el canal del receptor NMDA se encuentra bloqueado por iones de magnesio (Mg^{2+}) pero cuando la neurona postsináptica recibe un estímulo prolongado e intenso, el canal del receptor NMDA se abre y se une a glutamato (principal neurotransmisor excitador del SNC). Esto último, permite la entrada de sodio (Na^+) a la neurona post-sináptica dando como resultado un cambio en su potencial y su consecuente despolarización. Esta despolarización expulsa el Mg^{2+} del canal del NMDA y permite la entrada de iones de Ca^{2+} extracelular hacia el citosol de la neurona postsináptica (Lüscher, C., & Malenka, R. C.; 2012). El calcio citosólico activa proteínas quinasas como la calcio/calmodulina proteína quinasa II (CaMKII) la cual activa al receptor: ácido alfaamino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) para glutamato, el que a su vez aumenta la conductancia de Na^+ y K^+ seguido por el incremento de la

capacidad de respuesta al glutamato (Aguirre Siancas, E.; 2015), generando así la LTP.

Una vez comprendido el proceso mediante el cual se induce la LTP, es importante mencionar que la actividad débil de la neurona presináptica, como se muestra en la Figura 1-8, conduce a una despolarización modesta y un influjo menor de calcio a través de los receptores NMDA. Esto activa preferentemente a fosfatasas que desfosforilan a los receptores AMPA, promoviendo así la endocitosis del receptor y la LTD (Lüscher, C., & Malenka, R. C.; 2012).

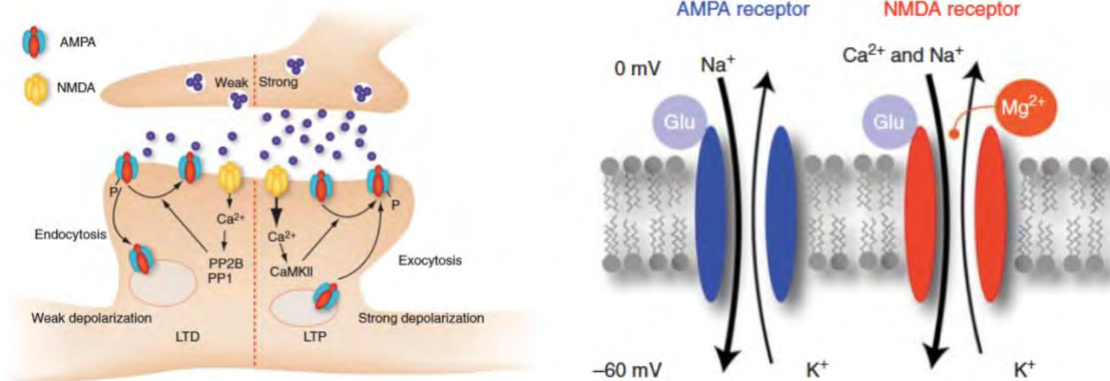


Figura 1-8 Representación esquemática de la LTP

Para la inducción de la LTP, es necesaria la activación del receptor NMDA para permitir a través de este el ingreso de calcio extracelular hacia el interior de la neurona postsináptica. (Imágenes tomadas de: Lüscher, C., & Malenka, R. C.; 2012)

1.3.6. Rol del BDNF en la LTP

Las neurotrofinas (NTs) son una familia de polipéptidos estructuralmente homólogos que regulan la supervivencia, el desarrollo (es decir, procesos como: crecimiento axonal y su guía hacia los órganos blanco, la estructura y la arborización de las dendritas), el funcionamiento y la plasticidad sináptica de las neuronas (Cabrera-Vásquez S.; 2007; Kozlov, E. M., et al; 2020). Dentro de esta familia se encuentran: el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4 (NT 4, también conocida como NT 4/5) (Huang, E. J., & Reichardt, L. F.; 2001, Cabrera-Vásquez S.; 2007, Kozlov, E. M., et al; 2020).

Es importante mencionar que, las NTs son las formas maduras de las proneurotrofinas (PRO-NT), mismas que son procesadas por proteasas extracelulares como la metaloproteinasa de matriz y la plasmina (Cabrera-Vásquez S.; 2007). Además, las NTs ejercen sus funciones biológicas a través de su unión a dos tipos de receptores transmembranales, unos de alta afinidad denominados receptores tirosina-quinasa o Trks (tropomyosin-related kinase); y otro tipo de receptor de baja afinidad, que es compartido por todas las NTs, denominado p75NTr (Cabrera-Vásquez S.; 2007, Huang, E. J., & Reichardt, L. F.; 2001) (Figura 1-9). En lo que respecta al receptor Trk, este presenta en su porción extracelular motivos ricos en leucinas (LRR1-3), dos grupos de cisteínas (C1 y C2) y dos dominios parecidos a inmunoglobulinas (Ig1 e Ig2). De su estructura es importante destacar que la unión específica de cada Trk es proporcionada por el dominio 2 parecido a la inmunoglobulina y en su porción intracelular se localizan los dominios de cinasa de tirosinas (Cabrera-Vásquez S.; 2007). En los mamíferos se han descrito tres genes que expresan los diferentes receptores Trks: el Trk-A, Trk-B y Trk-C, que unen respectivamente al NGF, BDNF y NT 4/5 (Cabrera-Vásquez S.; 2007). Para fines de este proyecto de investigación, se hará énfasis en el BDNF, su receptor y su participación en la LTP.

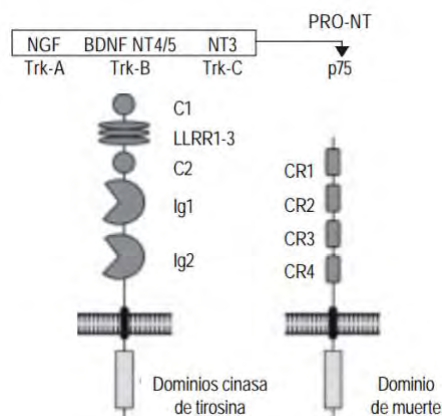


Figura 1-9 Receptores Trks y p75NTr

Los Trks se unen a las NTs con alta afinidad mientras que el p75NTr lo hace con baja afinidad, y con alta afinidad a las pro-neurotrofinas (PRO-NT). La interacción de las NTs con los receptores Trks induce una serie de cascadas de fosforilaciones intracelulares que conducen a la sobrevivencia celular, mientras que la unión de proneurotrofinas a p75 conduce a la apoptosis celular. (Imagen tomada de: Cabrera-Vásquez S.; 2007)

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos necesarios para el establecimiento de la LTP entre las células piramidales de CA3 y las neuronas piramidales de CA1 postsinápticas en el hipocampo han sido de gran interés, ya que se cree que estos mecanismos proporcionan un paradigma para la regulación de la fuerza y plasticidad sinápticas (Huang, E. J., & Reichardt, L. F.; 2001). Estudios recientes sugieren que una de las neurotrofinas, el BDNF, juega un papel fundamental en la plasticidad sináptica a largo plazo en el cerebro adulto (Shui-Wang Y., et al.; 2002).

El BDNF se expresa en neuronas piramidales CA3 y CA1 dentro del hipocampo, y su receptor TrkB se expresa en casi todas las neuronas del hipocampo, incluidas las células granulares del GD, las células piramidales CA3 y CA1 y las interneuronas inhibitoras (Huang, E. J., & Reichardt, L. F.; 2001, Lu, Y., et al; 2008). Las vesículas secretoras que contienen BDNF están presentes tanto en las terminales de los axones (sitio presináptico) como en las dendritas (sitio postsináptico) de las neuronas principales glutamatérgicas (células granulares y células piramidales) (Lu, Y., et al; 2008). Es importante mencionar que tras la estimulación de alta frecuencia, el BDNF se secreta de una manera dependiente del influjo de Ca^{2+} a través de los receptores de glutamato del subtipo NMDA o los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Lu, Y., et al; 2008).

Actualmente, los experimentos que involucran la inhibición del BDNF endógeno y la señalización a través de su receptor TrkB sugieren que se requiere del BDNF para generar la fase tardía de la potenciación a largo plazo (L-LTP) (Shui-Wang Y., et al.; 2002). Otros estudios han demostrado que la pérdida de TrkB de las neuronas piramidales excitadoras en el hipocampo y el prosencéfalo interfiere con la adquisición y consolidación de la memoria en muchos paradigmas de aprendizaje (Huang, E. J., & Reichardt, L. F.; 2001). Por otro lado, la señalización a través de p75NTR no parece ser importante, porque hay muy poca expresión de este receptor dentro del hipocampo (Huang, E. J., & Reichardt, L. F.; 2001).

Los efectos de BDNF en conjunto con su receptor, TrkB, son los siguientes:

- La activación del receptor TrkB tras la unión de BDNF aumenta la acumulación de vesículas sinápticas en la zona activa de la región presináptica, lo que potencia la transmisión sináptica (Leal, G., et al; 2014).
- El complejo BDNF-TrkB puede internalizarse y transportarse retrógradamente hacia el cuerpo celular. Una vez en el soma, los receptores activos pueden cambiar la expresión génica y la traducción del ARNm. Posteriormente, las proteínas recién sintetizadas pueden transportarse a lo largo del axón junto con las proteínas preexistentes (Leal, G., et al; 2014).

1.3.7. Hipocampo en el envejecimiento y el síndrome metabólico

Como se mencionó con anterioridad, el envejecimiento es un proceso natural que está asociado con el deterioro cognitivo, así como con deficiencias funcionales y sociales. Es importante mencionar que dicho deterioro cognitivo, puede afectar la calidad de vida y se ha demostrado que ocurre tanto en el envejecimiento normal como en condiciones patológicas, como las enfermedades neurodegenerativas (Bettio, L. E. B., et al; 2017) y las ECNT (Neumann K, et al; 2008). Con el envejecimiento normal, el deterioro cognitivo puede presentarse como déficits en ciertos dominios, incluida la memoria episódica (o declarativa), el aprendizaje espacial, la memoria de trabajo y la atención. Debido a lo anterior, una estructura de particular interés durante el proceso de envejecimiento y el deterioro cognitivo es el hipocampo (Bettio, L. E. B., et al; 2017).

A continuación, se mencionan algunos de los cambios que sufre el hipocampo tanto a nivel general como celular con el envejecimiento:

- En primer lugar, está documentado que a lo largo de la vida, se produce una reducción progresiva de la neurogénesis del hipocampo del adulto y con ello una disminución en el volumen de esta estructura (Klempin, F., Kempermann, G.; 2007).

- En segundo lugar, se ha documentado que alteraciones neurobiológicas observadas en el hipocampo envejecido, incluido el aumento del estrés oxidativo, la neuroinflamación y muerte celular que pueden deberse al deterioro de las estructuras neurovasculares, incluida la reducción de la membrana basal y la pérdida de pericitos, que pueden comprometer la barrera hematoencefálica (BHE). Esto genera fuga vascular lo que permite que las proteínas neurotóxicas ingresen al sistema nervioso central (SNC). Otras alteraciones neurobiológicas observadas durante el envejecimiento son: la alteración de la señalización intracelular y la expresión génica, así como la reducción de la neurogénesis y la plasticidad sináptica (Bettio, L. E. B., et al; 2017).
- En tercer lugar, se ha encontrado en investigaciones en roedores seniles que la disminución de la capacidad de memoria se correlaciona con reducción en la fase tardía de la potenciación a largo plazo, donde el BDNF como ya se ha mencionado es esencial para el mantenimiento de la función y la integridad estructural en el hipocampo (Aguirre Siancas, E.; 2015). En humanos, se ha demostrado que durante el envejecimiento hay una disminución de dicho factor neurotrófico y por ende, de su papel en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las neuronas (Wahl, D., et al; 2019).
- En cuarto lugar, es importante mencionar que algunos de los déficits sinápticos observados en el hipocampo envejecido pueden explicarse, al menos en parte, por alteraciones en la expresión de varias proteínas que juegan un papel clave en la sinaptogénesis y la estabilización sináptica, como la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95), sinapsina I, sinaptofisina, así como subunidades del receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5 metil4-isoxazolpropiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) (Bettio, L. E. B., et al; 2017).

Por último, para evidenciar el impacto de la resistencia a la insulina a nivel cerebral es de relevancia mencionar la relación que existe entre el síndrome metabólico y la Enfermedad de Alzheimer (EA).

La EA es la causa más común de demencia y una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad entre la población que envejece (Rojas-Gutierrez, E., et al; 2017). En cuanto a su patogénesis, los sellos o marcas distintivas son: las placas seniles o de beta amiloide (β A) y los ovillos neurofibrilares (resultantes de la hiperfosforilación de la proteína Tau que en situaciones sin patología es importante para la unión de los microtúbulos y el transporte de vesículas). El β A es un péptido de 36-43 aminoácidos que resulta de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (en inglés, APP, por Amyloid Precursor Protein) que en el caso de la EA es a través de la vía amiloidogénica (Rojas-Gutierrez, E., et al; 2017)

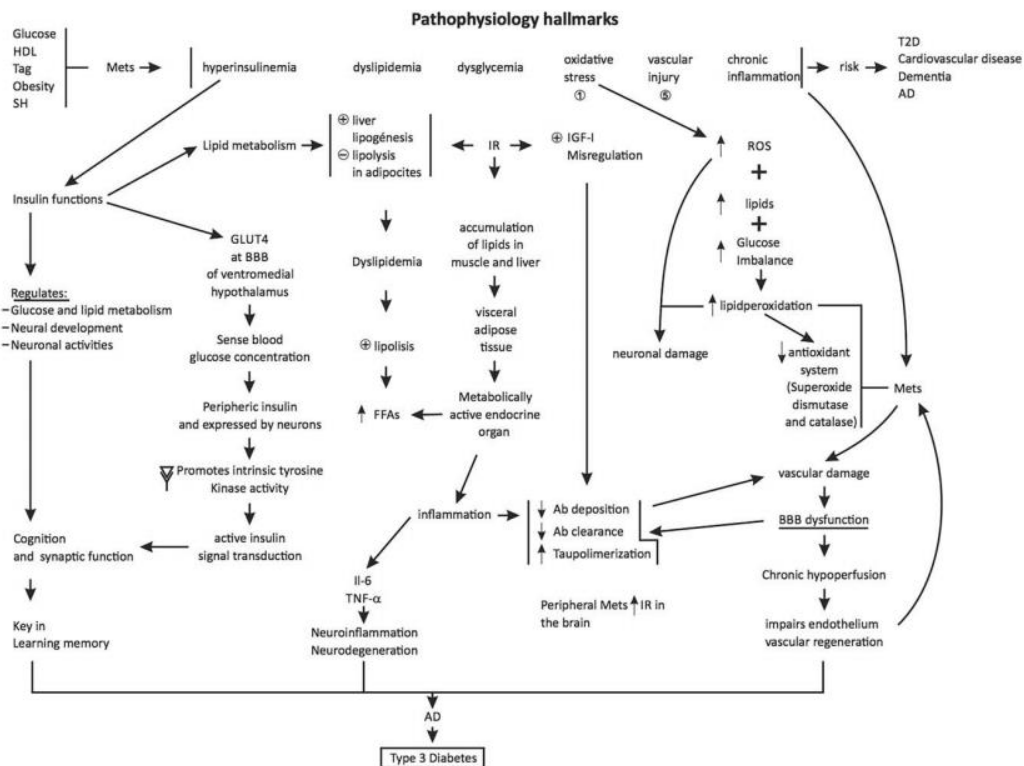
Recientemente, existe evidencia científica que sugiere que los procesos patológicos que suceden en el síndrome metabólico como el estado crónico de inflamación, hiperinsulinemia, dislipidemia, disglucemia, daño vascular y estrés oxidativo; incrementan de manera importante el riesgo de desarrollar EA en comparación a grupos controles de la misma edad y género (Rojas-Gutierrez, E., et al; 2017). Debido a lo anterior, es importante mencionar que otras de las funciones de la insulina a nivel cerebral son:

- Modular la expresión y procesamiento de la proteína precursora de β A (tanto in vivo como in vitro) (Rojas-Gutierrez, E., et al; 2017).
- La insulina en conjunto con el IGF-1, inhiben la producción de β A a través de la fosforilación/inactivación de GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 beta) mediada por Akt (proteína quinasa B). De esta forma, en situaciones sin patología se previene la acumulación intracelular anormal de β A (Rojas-Gutierrez, E., et al; 2017).

Sin embargo, cuando hay alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y por ende, un mal funcionamiento de sus vías de señalización (sobretudo vía PI3K/Akt), algunas de las situaciones resultantes son:

- El exceso de insulina (hiperinsulinemia) se intenta disminuir a través de su degradación por la enzima degradadora de insulina (IDE, por sus siglas en inglés), y en consecuencia altera la degradación de β A amiloide ya que también es sustrato de la IDE y esta se encarga de su aclaramiento. Por lo tanto, esta competencia de sustratos resulta en un aumento de β A, su acumulación y su efecto neurotóxico.
- La GSK3 β no es inactivada y esto favorece la hiperfosforilación de tau así como la formación de los ovillos neurofibrilares.

En el Esquema 1, se resumen los procesos patológicos que conectan la fisiopatología del síndrome metabólico con el desarrollo de la EA



Esquema 1 Vínculo fisiopatológico entre el SM y la EA.

(imagen obtenida de: Rojas-Gutiérrez, E., et al; 2017)

2. Antecedentes específicos

2.1. Neurotoxinas clostridiales

Las bacterias patógenas utilizan diversas estrategias para interactuar con los tejidos y células diana del organismo del huésped (Popoff, M. R., Poulain, B; 2010). Una de las estrategias mayormente conocidas y estudiadas es la producción de toxinas. Éstas pueden actuar tanto localmente como a distancia del sitio infeccioso, además, son capaces de alterar funciones específicas de sus células blanco (Popoff, M. R., Poulain, B; 2010). Sobre esto último, se ha demostrado que las toxinas pueden unirse a receptores localizados en la membrana celular y así interferir con vías de transducción de señales, formación de poros y actividades enzimáticas. Otras toxinas son capaces de ingresar al citosol para modificar dianas intracelulares específicas e interferir con procesos como síntesis de proteínas, ciclo celular, tráfico de vesículas y reordenamientos del citoesqueleto de actina (Popoff, M. R., Poulain, B; 2010).

Las bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, específicamente *C. tetani* y *C. botulinum*, son capaces de secretar neurotoxinas muy potentes denominadas toxina tetánica (TeTx) o tetanospasmina y la toxina botulínica (BoNT) (Calvo, A. C., et al; 2012), que en conjunto reciben el nombre de “neurotoxinas clostridiales” (CNTs), siendo estas las responsables del desarrollo de desórdenes neurológicos tanto en humanos como en animales (Calvo, A. C., et al; 2012).

C. Tetani se caracteriza por ser un bacilo gram-positivo, anaerobio estricto, flagelado y formador de esporas (Chapeton-Montes, D., Plourde, L., Bouchier, C. et al; 2019). La función principal de la TeTx es impedir la liberación de los neurotransmisores glicina y ácido γ -aminobutírico (GABA) de las interneuronas inhibitorias en la médula espinal, dando como resultado una parálisis espástica (Chapeton-Montes, D., Plourde, L., Bouchier, C. et al; 2019).

Por otro lado, las cepas productoras de BoNT son muy heterogéneas a diferencia de las cepas productoras de TeTx que son homogéneas y únicamente producen dicha toxina (Popoff, M. R., Poulain, B; 2010). Las neurotoxinas botulínicas son

producidas por las siguientes cepas neurotoxigénicas de clostridium: *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. barati* y *C. argentinensis* (Pirazzini, M et al; 2017). Una de las características más importantes de estas bacterias es la formación de esporas resistentes al calor que germinan en condiciones anaeróbicas ricas en sustratos para así lograr convertirse en bacilos productores de toxinas (Jeffery LA, Karim S; 2020). La neurotoxina botulínica se caracteriza, al igual que la TeTx, por sintetizarse como una proteína de 150 kDa que es inactiva o débilmente activa. Esta proteína precursora es posteriormente activada proteolíticamente gracias a proteasas bacterianas o del huésped (Popoff, M. R., Poulain, B; 2010). La función principal de la BoNT es inhibir la liberación de acetilcolina de las motoneuronas periféricas desencadenando una parálisis flácida (Chapeton-Montes, D., Plourde, L., Bouchier, C. et al; 2019).

2.2. Toxina tetánica

2.2.1. Síntesis, estructura y mecanismo de acción de la toxina tetánica

La TeTx, al igual que todas las CNTs, se sintetiza como un polipéptido único de 150 kDa, y cuenta con 1315 residuos de aminoácidos (Calvo, A. C. et al; 2012). Dicho polipéptido es escindido de manera post-traducciona por una proteasa bacteriana o del huésped dando lugar a una forma activa bicatenaria unida por interacciones no covalentes (Li, Y. et al; 1999) y por un solo puente disulfuro, compuesta además por una cadena pesada (H_c) y una cadena ligera (L_c) (Masuyer, G., Conrad, J., Stenmark, P; 2017). En la H_c de la TeTx se encuentran los dominios de translocación y unión al receptor, mientras que en la L_c se encuentra el dominio catalítico (Calvo, A. C. et al; 2012), como se muestra en la Figura 2-1.



Figura 2-1 Representación esquemática de la toxina tetánica y sus dominios

La cadena ligera (L_C) cuenta con actividad endopeptidasa dependiente de Zinc (Zn^{2+}), mientras que la cadena pesada (H_C) cuenta con los dominios de translocación y de unión al receptor. Éste último dominio cuenta con 2 subdominios: 1) Subdominio de translocación N-terminal (H_{CN}), y 2) subdominio C-terminal (H_{CC}). (Imagen tomada y modificada de Lalli, G. et al; 2003 y Calvo, A. C. et al; 2012).

A continuación, se detallan las características estructurales de cada cadena:

En primer lugar, la cadena pesada o “heavy chain” (H_C), consiste en dos subdominios de 50 kDa cada uno: el subdominio C-terminal (H_{CC}) y el subdominio de translocación N-terminal (H_{CN}), unidos por una sola cadena (Calvo, A. C. et al; 2012). Cada uno de estos subdominios está conformado por hojas beta unidas por bucles que sobresalen de la molécula (Calvo, A. C. et al; 2012), como se muestra en la Figura 2-2.

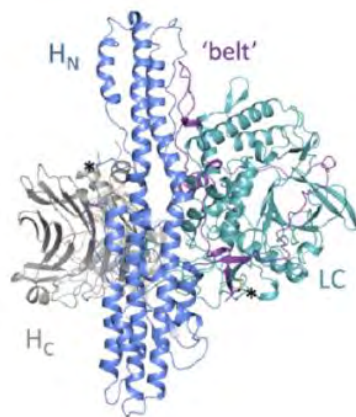


Figura 2-2 Representación gráfica de la estructura cristalina de la toxina tetánica.

En la imagen se representa de color azul cian al dominio catalítico de la cadena ligera (LC), color azul al dominio de translocación de la cadena pesada (en este gráfico, representado por las siglas HN) y de color gris al dominio de unión (en este gráfico, representado por las siglas HC). Además, los asteriscos (*) representan los puentes disulfuro. (Imagen tomada de Masuyer, G., Conrad, J., & Stenmark, P; 2017).

El H_C-TeTx (subdomino del fragmento C-terminal de la toxina tetánica), cuya estructura terciaria se muestra en la Figura 2-3, se caracteriza por su plegamiento o dominio β plegado, el cual gracias a estudios de cristalografía de rayos X, se demostró que tiene 4 regiones distintas de unión a carbohidratos, que son: lactosa (LAC), galactosa (GAL), ácido siálico (SIA) y N-Acetilgalactosamina (GalNac) (Calvo, A. C. et al; 2012). Es de relevancia mencionar que a través del análisis de la localización de estos sitios de unión a carbohidratos, se ha demostrado que el H_C-TeTx parece tener un papel más importante en la unión a gangliósidos que el subdominio N-terminal (Calvo, A. C. et al; 2012). Sin embargo, este fragmento también ha demostrado tener capacidad de activar receptores de neurotrofinas (Vázquez-Roque, R. et al; 2020). Esto último se detallará más adelante.

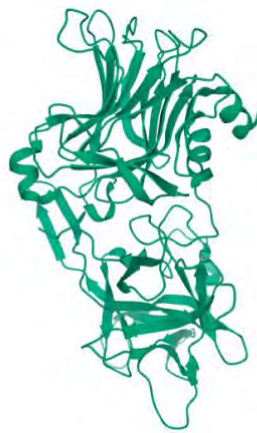


Figura 2-3 Estructura terciaria del H_C-TeTx

(Imagen obtenida de: D. Sehnal, A.S. Rose, J. Kovca, S.K. Burley, S. Velankar; 2018)

En segundo lugar, la cadena ligera o “light chain” (L_C), se caracteriza por su capacidad catalítica. Ésta última se debe a que es una metaloproteínasa dependiente de Zinc (Zn²⁺) de 50 kDa, capaz de hidrolizar proteínas que conforman al complejo SNARE (Popoff, M. R., Poulain, B; 2010). Las proteínas SNARE (proteína de fijación soluble de NSF [Factor sensible a la N-etilmaleimida]) forman un complejo que promueve la secreción de vesículas (exocitosis), mediante su fusión con la membrana plasmática (Masuyer, G., Conrad, J., & Stenmark, P; 2017), como se muestra en la Figura 2-4. Por lo tanto, si las proteínas SNARE son

hidrolizadas a este nivel, el proceso de neurotransmisión se verá afectado (Calvo, A. C; 2012). Esto último es importante porque una vez en el sitio de fusión, las vesículas sinápticas se unen a proteínas de andamio asociadas a una región de la membrana presináptica denominada: zona activa. Cabe mencionar que en este punto, las vesículas sinápticas aún no cuentan con capacidad fusogénica por lo que es necesario el ensamblaje de 3 proteínas: sinaptobrevina o proteína de membrana asociada a vesículas (Vesicle associated membrane proteins o VAMP, por sus siglas en inglés) que se encuentra a nivel de la membrana de la vesícula sináptica; SNAP25 (proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa) y sintaxina, éstas últimas se encuentran localizadas a nivel de la membrana plasmática de la neurona (Popoff, M. R., Poulain, B; 2010). El ensamblaje de estas tres proteínas forman el denominado “complejo SNARE”.

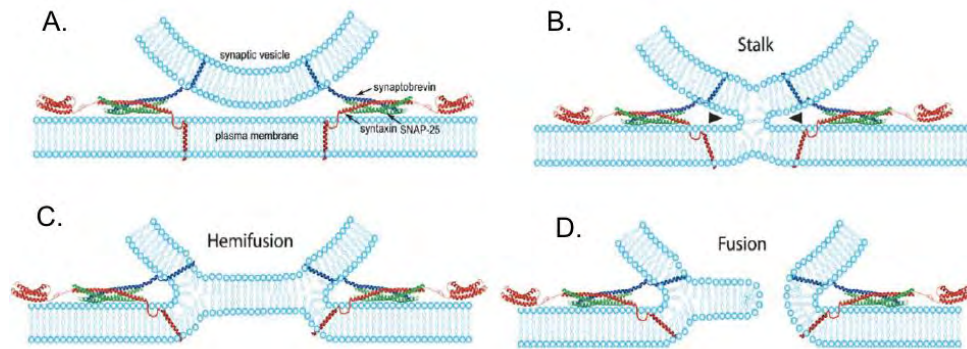


Figura 2-4 Complejo SNARE

Las altas fuerzas repulsivas entre las membranas lipídicas evitan que se fusionen. Por lo tanto, se cree que el ensamblaje de las proteínas SNARE (VAMP, SNAP25 y sintaxina) proporciona la energía que permite los reordenamientos de lípidos necesarios para la fusión. En primer lugar (imagen A), el ensamblaje de las proteínas SNARE acerca a las membranas lipídicas para iniciar el proceso de fusión a través de la formación de un tallo lipídico (imagen B). Posteriormente, el tallo se expande para favorecer la formación de un “diafragma de hemifusión de la bicapa lipídica” (imagen C). Finalmente, sucede una ruptura en alguno de los bordes de dicho diafragma, lo que completa el proceso de fusión entre vesícula y membrana. (Imagen tomada de: Palfreyman, M.T., Jorgensen E.M. 2010)

2.3. H_c-TeTx: Importancia, transporte y mecanismo de acción

La importancia del fragmento H_c-TeTx radica en su naturaleza no tóxica (Mendieta, L. et al; 2009, Moreno-Martinez, L., et al; 2020) y su capacidad de ser transportado retroaxonalmente hacia el SNC desde el sistema circulatorio (Calvo, A. C., et al;

2012, Moreno-Martinez, L., et al; 2020), de manera similar a como lo hace la toxina tetánica (TeTx), ganando así la entrada en sus células diana por medio de la interacción con balsas lipídicas y la posterior formación de vesículas endocíticas en un mecanismo dependiente de clatrina (Cubí, R., et al; 2013), este proceso se detallará más adelante.

Otro punto importante por destacar es que este fragmento puede activar los receptores de neurotrofinas (TrkA y TrkB), las cascadas de señalización en las que la proteína quinasa C (PKC), la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK-1/2) y la Akt (proteína quinasa B) están involucradas en la supervivencia neuronal en las neuronas corticales (Mendieta, L. et al; 2009, Vázquez-Roque, R., et al; 2020). Además, existen estudios que sugieren que el fragmento H_C-TeTx promueve la supervivencia neuronal del cerebelo, cuerpo estriado, hipocampo y neuronas de la corteza, protegiéndolas de apoptosis, estrés oxidativo e inflamación. Esto a su vez, podría estar asociado a un mejoramiento en la función motora y cognitiva (Vázquez-Roque, R., et al; 2020). Esto se detallará en el apartado de “Evidencias actuales”.

En cuanto al transporte neuronal, aunque este normalmente transporta enzimas y orgánulos celulares desde las terminales distales del axón hasta los cuerpos celulares neuronales, también puede ser aprovechado por la TeTx para penetrar en la BHE y entrar en el SNC (Toivonen, J. M. et al; 2010). A partir de este hecho, es importante mencionar que los gangliósidos (glucoesfingolípidos cuyos componentes son un grupo pequeño de azúcares que incluye ácido siálico) fueron el primer componente de la membrana celular que se demostró que se une tanto a la TeTx como a la BoNT, para su internalización a nivel de neuronas motoras (Halpern, J. L., Neale, E. A; 1995, Karp, G., Araiza Martinez, M. E; 2014, Toivonen, J. M. et al; 2010). Los gangliósidos son especialmente abundantes en el cerebro, donde su presencia en la materia gris es aproximadamente 5 veces mayor que en la materia blanca (Kolter, T; 2012), además, la TeTx muestra alta afinidad por los polisialogangliósidos GT1b y GD1b; y aproximadamente 2 a 3 veces menor afinidad por el monosialogangliósido GM1 y GD1a (Halpern, J. L., Neale, E. A; 1995).

Sin embargo, el H_C-TeTx también puede tener tráfico retrógrado dentro de las neuronas motoras en estructuras positivas para Rab-7 (pequeña GTPasa que controla el transporte a los compartimentos endocíticos tardíos, como los endosomas y lisosomas) que se comparten con los receptores de neurotrofina p75^{NTR} y TrkB (Calvo, A. C., et al; 2012, Guerra, F., et al; 2016). Por lo tanto, el H_C-TeTx podría viajar acompañado de los receptores tirosina quinasa B (TrkB) y su receptor común p75^{NTR} cuando se activan por sus ligandos endógenos: el factor de crecimiento nervioso (NGF) y/o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Esto sugiere que el H_C-TeTx utiliza la misma maquinaria que las neurotrofinas cuando se endocita y transporta (Parra I., et al; 2020).

La unión de las CNTs (incluyendo el fragmento H_C-TeTx) es seguida por endocitosis dependiente de clatrina y tráfico intracelular dentro de vesículas endocíticas neutras (Toivonen, J. M. et al; 2010). Posteriormente, como se muestra en la Figura 2-5, las vesículas se mueven retroaxonalmente hacia el cuerpo de la célula de la neurona motora utilizando un transporte axonal rápido (Toivonen, J. M. et al; 2010). Este tipo de transporte retroaxonal rápido requiere tanto de filamentos de actina como de microtúbulos, además de proteínas motoras que interactúan con los microtúbulos como dineína y miembros de la superfamilia de miosina (particularmente, miosina Va) (Lalli, G., et al; 2003).

Una vez en el soma, el fragmento H_C-TeTx puede llegar más lejos: a las dendritas, y posteriormente puede ser transportado a interneuronas que se conectan sinápticamente con las neuronas motoras (Toivonen, J. M. et al; 2010).

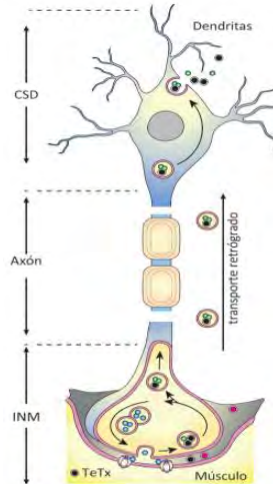


Figura 2-5 Internalización y transporte retrógrado del Hc-TeTx.

En el esquema se muestra el transporte retroaxonal del fragmento Hc-TeTx, este se une a los polisialogangliósidos y a las proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) para poder ser internalizado por endocitosis y viajar de forma retrógrada al soma neuronal procediendo a salir al espacio sináptico y repetir el proceso de internalización a la siguiente neurona, este proceso se denomina “salto sináptico”. (Imagen tomada de: Parra I., et al; 2020).

Retomando la interacción entre el fragmento Hc-TeTx y los receptores Trks (A y B) y p75NTR, en la Figura 2-6, se muestra la vía de señalización del fragmento Hc-TeTx.

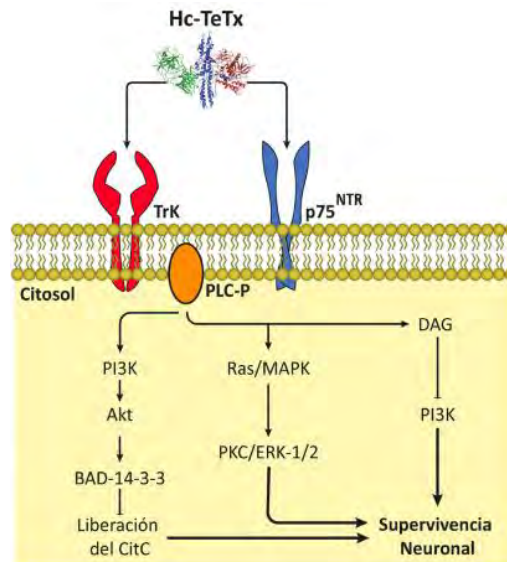


Figura 2-6 Interacción del fragmento Hc-TeTx con receptores de neurotrofinas.

En el esquema se muestra las vías fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/Akt), fosfolipasa-c (PLC/PKC), y la proteína cinasa 1/2 activada por mitógenos (MAPK). Todas estas rutas conducen a la supervivencia neuronal. (Imagen tomada de: Parra I., et al; 2020).

2.4. Evidencia actual sobre el uso del Hc-TeTx en el SNC

En las últimas 2 décadas, se ha propuesto que el fragmento Hc-TeTx cuenta con un alto potencial trófico (Vázquez-Roque, R., et al; 2020, Parra I., et al; 2020) y esto se debe a que al no tener los efectos tóxicos de la toxina nativa (toxina tetánica), mantener la capacidad de unión a membrana, internalización y transporte retrógrado con localización preferencial en motoneuronas, como lo han demostrado estudios in vitro e in vivo (Netzahualcoyotzi, C., & Tapia, R.; 2018); se ha permitido su estudio.

Otros hallazgos de las propiedades de éste fragmente se mencionarán a continuación:

- El fragmento Hc-TeTx es capaz de prevenir la muerte neuronal inducida por apoptosis debido a la privación de potasio y a la administración intraestriatal de la neurotoxina MPP+ (1-metil-4-fenilpiridinum) (Vázquez-Roque, R., et al; 2020). Es importante mencionar que la MPP+ produce cambios bioquímicos similares en ratas a los observados en la Enfermedad de Parkinson (EP), como la degeneración terminal dopaminérgica y la consiguiente aparición de déficits motores (Moreno-Galarza, N., et al; 2018). El mecanismo de acción de la MPP+ es debido a su capacidad de penetrar neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina y actuar sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial, generando así un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), neuroinflamación y una consecuente crisis energética, siendo estos resultados la causa de degeneración y muerte neuronal (Moreno-Galarza, N., et al; 2018). Por lo tanto, se ha demostrado que el fragmento Hc-TeTx activa in vitro vías de señalización reguladas por neurotrofinas de una manera dependiente del receptor Trk y tiene efectos neuroprotectores en cultivos de células granulares cerebelosas primarias expuestas a concentraciones bajas tóxicas de potasio o tratadas con MPP+ (Netzahualcoyotzi, C., & Tapia, R.; 2018). Esto se debe a que este fragmento estimula la síntesis y liberación de factores neurotróficos como el BDNF, y por sí mismo, ejerce efectos

neuroprotectores o neurorestauradores en modelos de enfermedades neurodegenerativas como EP, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA); y modelos animales de depresión e isquemia cerebral (Vázquez-Roque, R., et al; 2020).

- A nivel morfológico, el fragmento H_C-TeTx también ha demostrado mejorar la arquitectura dendrítica del sistema límbico de ratas envejecidos. Siendo evidentes los cambios morfológicos a nivel del hipocampo (CA1, CA3 y GD) y el núcleo accumbens, que son regiones esenciales para las funciones cognitivas y motoras (Vázquez-Roque, R., et al; 2020).
- Otros estudios in vitro e in vivo han demostrado su capacidad para transportar moléculas terapéuticas unidas por fusión química o genética, como la perodixasa de rábano picante, la β -galactosidasa, la superóxido dismutasa, la cardiotrofina-1 y el factor de supervivencia de las neuronas motoras (Ciriza, J., et al.; 2008).
- Por último, se ha demostrado que BDNF y H_C-TeTx, son capaces de activar vías de supervivencia como Akt (mediador general de las señales de supervivencia), PLCG-1 (fosfoinosítido fosfolipasa C gamma 1) o MAPK en neuronas granulares corticales y cerebelosas cultivadas. Por lo tanto, el BDNF puede rescatar de los procesos de apoptosis a diferentes tipos de neuronas, como neuronas estriatales, cerebelosas o neuronas motoras. De esta forma, se ha propuesto la administración de BDNF para posibles terapias en enfermedades neurodegenerativas como la ELA, EP o Enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, estos factores presentan un acceso deficiente a las neuronas motoras y se han observado varios efectos secundarios. El HC-TeTx podría resolver este problema y esta proteína podría tener un posible uso terapéutico en enfermedades neuromusculares como la ELA. La combinación de estas proteínas en el tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas podría ser una poderosa herramienta para la terapia génica (Ciriza, J., et al.; 2008).

Con base en lo anterior, el fragmento H_C-TeTx se considera una herramienta útil y valiosa como estrategia terapéutica en el sistema nervioso central para mejorar el proceso patológico de enfermedades neurodegenerativas como EP y ELA. Por ello, se han realizado estudios en roedores que demuestran que la inyección intramuscular del fragmento protege significativamente contra la neurodegeneración, los déficits motores y la parálisis de las extremidades (Netzahualcoyotzi, C., & Tapia, R.; 2018)

3. Planteamiento del problema

En la actualidad las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), como las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, son consideradas uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud debido al creciente número de casos, su contribución a la mortalidad, su aparición en edades cada vez más tempranas. El hecho de que son la causa más frecuente de incapacidad prematura y la complejidad y costo elevado de su tratamiento (Córdova-Villalobos J.A., et al; 2008, Barba Evia J.R; 2018). En México, los resultados de la ENSANUT 2018, reportaron que la población mayor a 20 años que correspondía al 65.4% del tamaño de la muestra (126.5 millones de habitantes), presentaban 76.8% de las mujeres y 73% de los hombres sobrepeso u obesidad mientras que el número total de casos con diagnóstico de diabetes tipo 2 (DT2) incremento de 6.4 millones de personas en 2012 a 8.6 millones de personas en 2018 (INEGI, INSP, Secretaría de Salud; 2018). Estos datos demuestran que la obesidad y DT2, cuyos componentes fisiopatológicos forman parte del síndrome metabólico, son padecimientos de gran prevalencia en nuestro medio. Es importante mencionar que la DT2 se observa con mayor frecuencia en la población de adultos mayores (la cual incrementa de forma acelerada), esto sustentado por las cifras reportadas por la Federación Internacional de Diabetes (IDF) en 2019 donde México contaba con un número total de ≥ 500 miles de casos en la población mayor a 65 años (IDF, 2019) (Mapa 1-1).

Además, existe evidencia que ha identificado a la obesidad, síndrome metabólico y al proceso de envejecimiento como factores de riesgo para el desarrollo de deterioro cognitivo, demencia y Enfermedad de Alzheimer (Bettio, L.E.B; et al; 2017); siendo de particular interés el impacto de estas entidades sobre el hipocampo, estructura cerebral clave para procesos de aprendizaje y memoria.

En la actualidad ha surgido el interés de estudiar al fragmento Hc-TeTx debido a su naturaleza no tóxica (Mendieta, L. et al; 2009, Moreno-Martínez, L., et al; 2020) y su capacidad de ser transportado retroaxonalmente hacia el SNC desde el sistema circulatorio (Calvo, A. C., et al; 2012, Moreno-Martínez, L., et al; 2020). Aunado a esto último, hay evidencia de que el Hc-TeTx podría viajar acompañado de los

receptores tirosina quinasa B (TrkB) y su receptor común p75NTR cuando se activan por sus ligandos endógenos: el factor de crecimiento nervioso (NGF) y/o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Esto sugiere que el Hc-TeTx utiliza la misma maquinaria que las neurotrofinas cuando se endocita y transporta (Parra I., et al; 2020). Por lo tanto, este fragmento podría mejorar el proceso patológico de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo los cambios cerebrales propios del envejecimiento como la disminución de factores de crecimiento como el BDNF y la reducción progresiva de la neurogénesis del hipocampo del adulto (Klempin, F., Kempermann, G.; 2007, Wahl, D., et al; 2019).

En cuanto a los beneficios del fragmento Hc-TeTx, estudios in vitro e in vivo han demostrado que tiene la capacidad de: prevenir la muerte neuronal inducida por apoptosis debido a la privación de potasio y a la administración intraestriatal de la neurotoxina MPP+; activar vías de supervivencia celular siendo evidentes los cambios morfológicos a nivel del hipocampo (CA1, CA3 y GD); y mejorar la arquitectura dendrítica del sistema límbico de ratas envejecidas (Vázquez-Roque, R., et al; 2020).

Tomando en cuenta lo anteriormente planteado, es pertinente preguntar: ¿Cómo la administración del Hc-TeTx modificaría la respuesta inflamatoria y oxidativa en neuronas hipocampales en un modelo de envejecimiento con síndrome metabólico?

4. Pregunta de investigación

¿La Hc-TeTx modificaría la respuesta inflamatoria y oxidativa en neuronas hipocampales en un modelo de envejecimiento con síndrome metabólico?

5. Justificación

En la actualidad, el hipocampo es una región crítica para el proceso de aprendizaje y desarrollo de memorias a corto y largo plazo. Sin embargo, se reporta que durante el proceso de envejecimiento y patologías como el síndrome metabólico, el hipocampo resulta vulnerable a cambios tanto estructurales como moleculares. Dentro de las alteraciones neurobiológicas a nivel hipocampal, se encuentran: la reducción progresiva de la neurogénesis del hipocampo del adulto y por ende, disminución del volumen hipocampal; aumento del estrés oxidativo y neuroinflamación; alteraciones en la BHE; disminución de la plasticidad sináptica y proteínas claves para la sinaptogénesis; disminución en los niveles de factores neurotróficos como el BDNF, entre otros (Aguirre Siancas, E; 2015, Bettio, L.E.B; et al; 2017). Todos estos cambios se asocian con el deterioro cognitivo dependiente de la edad y con los efectores deletéreos de enfermedades metabólicas a nivel del SNC, sobre todo la resistencia a la insulina.

Debido a lo anterior y al efecto que esto puede tener en la calidad de vida de los adultos mayores con deterioro cognitivo y presencia de ECNT, con esta investigación se busca proponer fármacos que ayuden a mejorar los procesos de plasticidad neuronal y por ende, la funcionalidad cognitiva de estos pacientes; a través de la disminución del impacto negativo que generan procesos como estrés oxidativo e inflamación sistémica crónica de bajo grado en el tejido cerebral.

6. Hipótesis

6.1. Hipótesis de investigación (Hi)

La administración del Hc-TeTx disminuye la respuesta oxidativa e inflamatoria en neuronas hipocampales en un modelo de envejecimiento con síndrome metabólico.

6.2. Hipótesis nula (Ho)

La administración del Hc-TeTx no disminuye la respuesta oxidativa e inflamatoria en neuronas hipocampales en un modelo de envejecimiento con síndrome metabólico.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de la Hc-TeTx sobre la respuesta inflamatoria-oxidativa en el hipocampo de ratas envejecidas con síndrome metabólico y sus consecuencias sobre la memoria de reconocimiento.

7.2. Objetivos específicos

- Identificar los cambios zométricos y bioquímicos en ratas administradas con el Hc-TeTx bajo condiciones de envejecimiento y síndrome metabólico.
- Analizar la memoria de reconocimiento de objetos en ratas administradas con el Hc-TeTx bajo condiciones de envejecimiento y síndrome metabólico.
- Valorar la respuesta inflamatoria y oxidativa en ratas envejecidas y con síndrome metabólico administradas con Hc-TeTx.

8. Diagrama metodológico

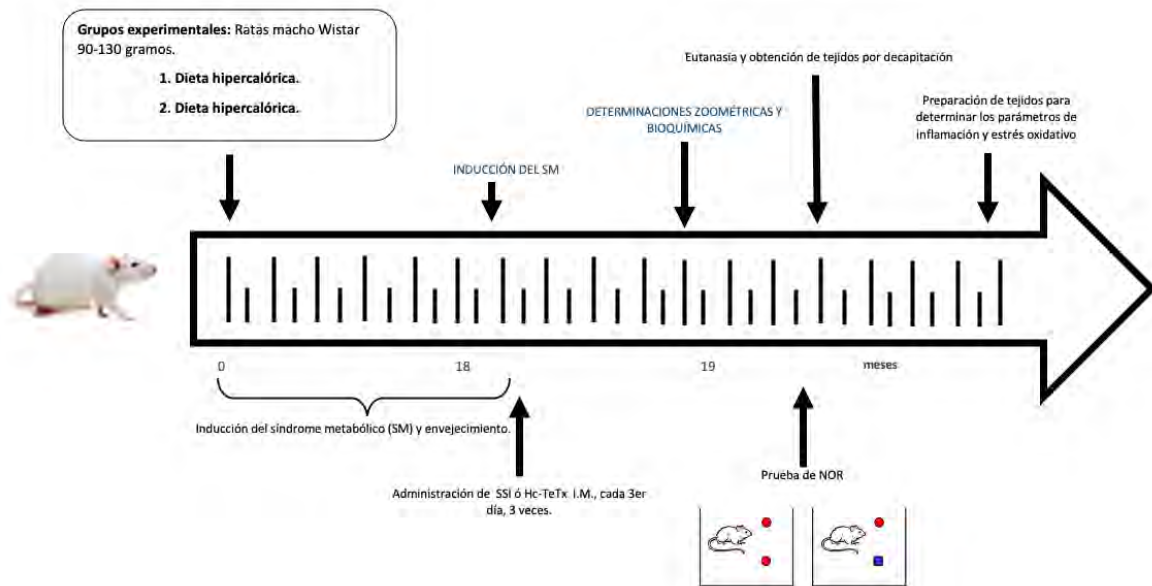


Figura 8-1 Diagrama metodológico

9. Metodología

9.1. Tipo de estudio

El presente trabajo se trata de una investigación pre-clínica orientada al estudio del efecto de la administración del fragmento H_c-TeTx sobre la respuesta inflamatoria y oxidativa en el hipocampo de ratas envejecidas con síndrome metabólico.

9.2. Universo

Ratas macho (n=20) de la cepa Wistar de 18 meses de edad y con un peso aproximado de 90-130 gramos (gr), procedentes del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Las ratas se mantuvieron en jaulas con libre acceso de agua y alimento (ad libitum), temperatura y humedad constantes y con una iluminación controlada a base de ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas como lo establece la “**NOM-062-ZOO-1999**, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

9.3. Unidad de análisis

Ratas macho (n=20) de la cepa Wistar con un peso aproximado de 90-130 gr. Los sujetos experimentales se dividirán en 2 grupos (n=10 / grupo): grupo control (DHC o dieta hipercalórica) y grupo experimental (DHC + Hc-TeTx). Cabe mencionar que ambos grupos tendrán en común el síndrome metabólico y el proceso fisiológico de envejecimiento, la diferencia es la administración de Hc-TeTx.

9.4. Criterios de inclusión y exclusión

9.4.1. Criterios de inclusión

- Ratas macho de la cepa Wistar de 18 meses de edad.

9.4.2. Criterios de exclusión

- No aplican.

9.5. Variables por estudiar

- Variables zoométricas: peso corporal, talla (longitud total), perímetro abdominal, índice de masa corporal (IMC) e índice de Lee.
- Variables conductuales: actividad motora, memoria a corto y largo plazo.
- Variables bioquímicas: glucosa e insulina basales, HOMA-IR, HOMA-S%, HOMA-B, fructosamina, corticoesterona, Adiponectina, leptina, triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol, LDL-c, HDL-c, VLDL-c.

9.6. Inducción a síndrome metabólico

Se administrará durante 18 meses tanto al grupo DHC como al DHC+Hc-TeTx, la dieta **PicoLab® Rodent Diet 20 5053** Figura 9-1, constituida por:

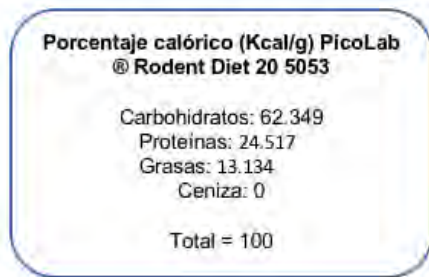


Figura 9-1 Dieta PicoLab® Rodent Diet 20 5053

9.7. Administración de HC-TeTx

El fragmento Hc-TeTx (liofilizado) es sintetizado y donado por el Dr. José Aguilera, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Dicho fragmento será administrado en 3 ocasiones a una concentración de 0.05 mg/kg de peso, iniciando el 2 de octubre de 2020 (2da y 3ra administración, los días 5 y 8 de octubre, respectivamente).

9.8. Zoometría

Se realizará evaluación zoométrica semanal, en donde se determinarán los siguientes parámetros:

Peso corporal: Se utilizará una balanza de marca VoLKë® modelo SF-400 con capacidad y precisión de 5000 g x 1 g/ 177 oz x 0.1 oz y el peso se obtendrá en gramos. El procedimiento se realizará según las recomendaciones de Cossio et al. (2010).

Talla (Longitud total): Para obtener la longitud total se utilizará una cinta métrica antropométrica marca Lufkin modelo W606PM de acero flexible. El procedimiento se realizará según las recomendaciones de Cossio et al. (2010) tomando como puntos de referencia la base de la cola a la punta de la nariz.

La medición de los tres parámetros zoométricos se realizará una vez a la semana por triplicado y se obtendrá el promedio. Con los parámetros zoométricos obtenidos se estimará la composición corporal de un modelo bicompartimental mediante:

Índice de masa corporal (IMC): Evalúa el peso del animal en relación con su altura. Se calculará mediante el índice de Quetelet (OMS, 2006): $IMC = \text{Peso} / \text{talla}^2$

9.9. Pruebas conductuales

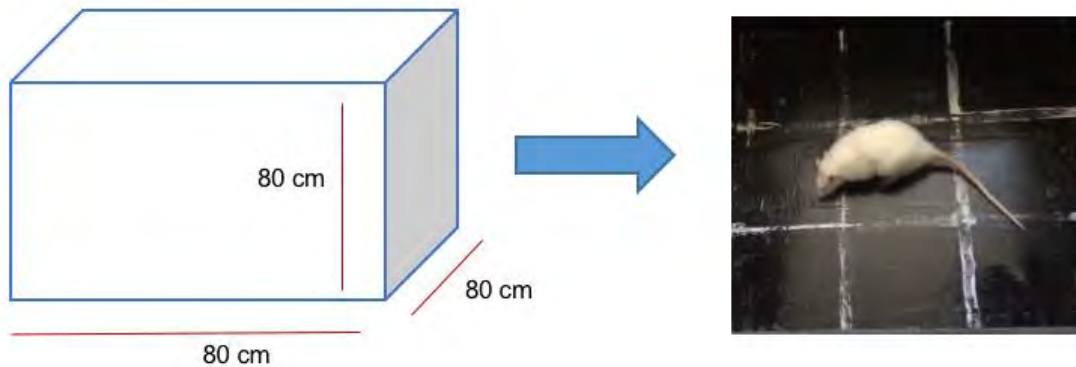


Figura 9-2 Campo abierto

A los 18 meses se evaluarán las conductas de actividad motora, memoria y ansiedad por medio de la Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT).

Durante tres días previos a la aplicación de las pruebas conductuales, se realizará una fase de habituación, la cual consiste en colocar a los animales durante 1 hora en el cuarto de aplicación de la prueba para lograr la adaptación al sitio. Las pruebas conductuales serán aplicadas en un horario correspondiente entre las 8:00 a 13:00 hrs.

- NORT

La prueba se basa en la tendencia de los animales a ocupar tiempo explorando objetos novedosos entre objetos familiares.

Consta de 4 fases: a) Adaptación (Actividad motora): los animales de manera individual se les permite explorar un campo abierto durante 5 minutos, posteriormente las ratas son colocadas nuevamente en su jaula; b) Reconocimiento de objetos familiares: Se realiza 24 horas después de la adaptación y los animales

son expuestos a dos objetos idénticos colocados en dos esquinas y se cuantifica el tiempo que los animales utilizan para explorar cada objeto durante un periodo de 5 minutos; c) Reconocimiento de objetos novedosos (memoria a corto plazo): Posterior a un periodo de familiarización de la fase anterior de dos horas, uno de los objetos familiares se cambia por un objeto novedoso y se permite la exploración durante 5 minutos; d) Reconocimiento de objetos novedosos (memoria a largo plazo): Se realiza 24 horas posteriores a la fase anterior, donde el objeto novedoso es remplazado por otro objeto novedoso y se permite la exploración por 5 minutos.

La prueba se llevará a cabo en una caja negra de campo abierto (80 cm de ancho x 80 cm de largo x 80 cm de alto) (Figura 9-2) y se considerarán comportamientos de investigación: orientación de la cabeza, el olfateo o algún contacto deliberado con alguno de los objetos a una distancia menor a 2 cm o al tocar algún objeto con la nariz.

Se determinará el tiempo de exploración de ambas fases: el reconocimiento de objetos familiares y novedosos, para posteriormente calcular un índice de discriminación (DI) el cual expresa la diferencia en el tiempo de exploración entre objetos familiares y novedosos y posteriormente se divide el valor por la cantidad total de exploraciones de objetos novedosos y familiares.

$$DI = (Tx - Ty) / (Tx + Ty)$$

Donde Tx: tiempo de exploración de objetos novedosos x y Ty tiempo de exploración de objetos familiares.

9.10. Determinaciones bioquímicas

Una vez finalizadas las pruebas conductuales, se obtendrán las muestras sanguíneas con el fin de valorar los parámetros bioquímicos anteriormente mencionados.

Las concentraciones de glucosa, lípidos (triglicéridos, colesterol y lípidos totales) y lipoproteínas séricas (LDL-C, HDL-C y VLDL-C) se determinarán por kits

comerciales (Spinreact) con un analizador automático AutoKem. La concentración de ácidos grasos libres (AGL) se determinará de acuerdo con el método descrito por Brunk y Swanson (Brunk S, Swanson J.; 1981).

Las concentraciones plasmáticas de insulina se determinarán por un inmunoensayo ELISA. Las concentraciones de insulina se obtendrán de una curva estándar con un rango de 0-20 $\mu\text{U/ml}$. El área bajo la curva de glucosa e insulina (AUC) se calculará usando el método trapezoidal (Pittier et al 2002; Purves 1992).

9.11. Eutanasia

Finalizada la obtención de las muestras sanguíneas, se procederá a anestesiarse y decapitar a cada rata con el objetivo de obtener el cerebro, disecar el hipocampo y preparar los tejidos para realizar las determinaciones bioquímicas de estrés oxidativo e inflamación.

9.12. Técnicas para determinar estrés oxidativo en hipocampo

El tejido hipocámpal perfundido fue incubado a 37°C en una estufa durante 3 días con una solución 50:50 de ácido nítrico y ácido perclórico hasta degradar el tejido. El sobrenadante se diluyó 1:10 en agua desionizada.

- Cuantificación del malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenes (4HDA)

Los niveles de MDA y 4HDA fueron cuantificados por el método de Estebauer y Zollner (1989). A 100 μL del sobrenadante se adicionaron 650 μL de la solución 1 (1-metil-2-(6-fenil-3-indol) 10.3mM en acetonitrilo y metanol), y 150 μL de ácido metanosulfónico. Las muestras se agitaron e incubaron a baño María, 45°C , 1 hora, se centrifugaron a 3500 rpm, 10 minutos. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 586 nm. Las concentraciones se obtendrán interpolando la absorbancia de las muestras en la curva estándar patrón de MDA; 1, 1, 3, 3 tetrahidroxipirano (0.5 a 5 μM).

- Cuantificación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD) fue analizada mediante el método del pirogalol en el que el pirogalol en medio básico se auto-oxida generado en el medio de reacción radicales superóxido, de esta forma la reacción radicalaria se propaga, acelerando la auto-oxidación absorbiendo el paso de luz a 420 nm. La presencia de SOD inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de auto-oxidación del Pirogallol a 25°C y pH 8.2.

- Cuantificación de la actividad de catalasa (CAT)

La cuantificación de la actividad de catalasa (CAT) se realizó mediante el uso de espectrofotometría de luz ultravioleta, según lo establecido por Nelson y Kiesow en 1972. Las muestras de tejido fueron homogenadas con buffer de fosfato de potasio 20mM (pH 7.4 y 150 mM NaCl, con dilución 1:20) y centrifugado a 10,000 RPM por 10 min a 4°C. El ensayo consistió en mezclar 2.0 mL de buffer de fosfato de potasio (50 mM a pH 7.0), 0.05 mL de H₂O₂ (0.3) M y 0.05 mL del homogenado. Los cambios en la absorbancia de H₂O₂ se siguieron por 60 segundos a 240 nm. La actividad de catalasa se calculó como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína que es igual a U/mg de proteína.

9.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico será realizado con ayuda del programa GraphPad Prism versión 9. Se graficará la media \pm el error estándar (SEM) de los datos obtenidos de acuerdo con la distribución que presenten. Un nivel de significancia menor del 0.05 (valor $p < 0.05$) será considerado significativamente diferente.

9.14. Consideraciones éticas

En el apartado “Anexos”, se adjunta el comprobante del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Es importante mencionar que este estudio se basa en lo establecido en la “**NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso**

de los animales de laboratorio". Además, se hizo todo lo posible para minimizar el número de animales utilizados y asegurar un mínimo de dolor y / o malestar de cada animal.

9.15. Financiamiento del proyecto

Para los recursos financieros del presente proyecto, la Vicerrectora de docencia y estudios de posgrado (VIEP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) asigna un fondo económico bimestral para la compra de reactivos.

Otra parte de los recursos se obtendrán del capital propio del D.C. Alfonso Daniel Díaz Fonseca quien labora en la BUAP como investigador de la Facultad de Ciencias Químicas.

Finalmente, en cuanto a la infraestructura y equipamiento, es importante mencionar que la Facultad de Ciencias Químicas de la institución sede ya mencionada, cuenta con laboratorios ampliamente adaptados para la realización de este proyecto.

10. Resultados

Se realizó la comparación entre los grupos DHC y DHC+H_C-TeTx; y se obtuvieron los siguientes resultados.

10.1. Variables zoométricas

Variables zoométricas	Grupo DHC	Grupo DHC + H_C-TeTx
Peso corporal	279.7±5.02	305.8±12.40
Talla (longitud total)	19.9±0.13	20.0±0.27
Perímetro abdominal	14.5±0.9	15.1±0.23
Índice de masa corporal (IMC)	0.7±0.03	0.7±0.04
Índice de Lee	32.3±0.17	33.7±0.70

Tabla 10-1 Análisis de variables zoométricas.

Los datos representan la media de los valores ± el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student.

Al comparar ambos grupos, se identificaron en todas las variables zoométricas del grupo DHC+H_C-TeTx con respecto al grupo DHC; los siguientes aumentos: 9.3% (p=0.0607) de peso, 0.7% (p=0.5663) de talla, 4.6% (p=0.0434) de perímetro abdominal, 8% (p=0.3313) de IMC y 4.4% (p=0.0632) de índice de Lee. El perímetro abdominal fue la única variable zoométrica que demostró una diferencia estadísticamente significativa (p=0.0434) como se muestra en la Tabla 10-1.

10.2. Pruebas conductuales

Para demostrar el efecto de la administración H_C-TeTx sobre la modificación en la conducta de memoria a corto y largo plazo, se realizó la prueba de reconocimiento

de objetos novedosos (NORT). Ésta última consistió en 4 fases y se obtuvieron los siguientes resultados en cada una de ellas:

Fase 1: Habitación (actividad motora)

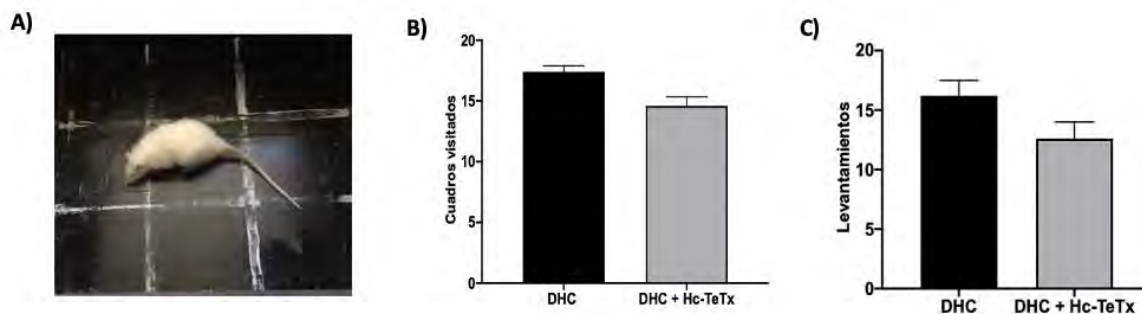


Figura 10-1 Fase 1: Habitación y evaluación de la actividad motora.

A) La habituación duró 1 hora en el campo abierto. B y C) Los datos representan la media de los valores \pm el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student, sin embargo, no hubo diferencia significativa en el número total de cuadros visitados y de levantamientos al comparar ambos grupos.

En la fase de habituación, la relación del total de cuadros visitados que se obtuvo fue de 17.4 ± 0.75 para el grupo DHC y 14.6 ± 1.12 para el grupo DHC+Hc-TeTx. Al compararse ambos grupos, se observó que el grupo DHC+Hc-TeTx tuvo una disminución del 16.1% ($p= 0.080$) en la cantidad de cuadros visitados, interpretándose como una diferencia no estadísticamente significativa (Figura 10-1-B).

De igual manera, fue evaluado el número total de levantamientos, obteniendo los siguientes resultados: 16.2 ± 1.93 y 12.6 ± 2.09 para el grupo DHC y DHC +Hc-TeTx, respectivamente. Al compararse ambos grupos, el grupo DHC+Hc-TeTx contó con una disminución del 22.2% ($p= 0.362$) de levantamientos, lo cual se interpreta como una diferencia no estadísticamente significativa (Figura 10-1-C).

A continuación, se demuestran dos esquemas que representan la trayectoria recorrida por ratas tanto del grupo DHC como del DHC+Hc-TeTx (Figura 10-2).

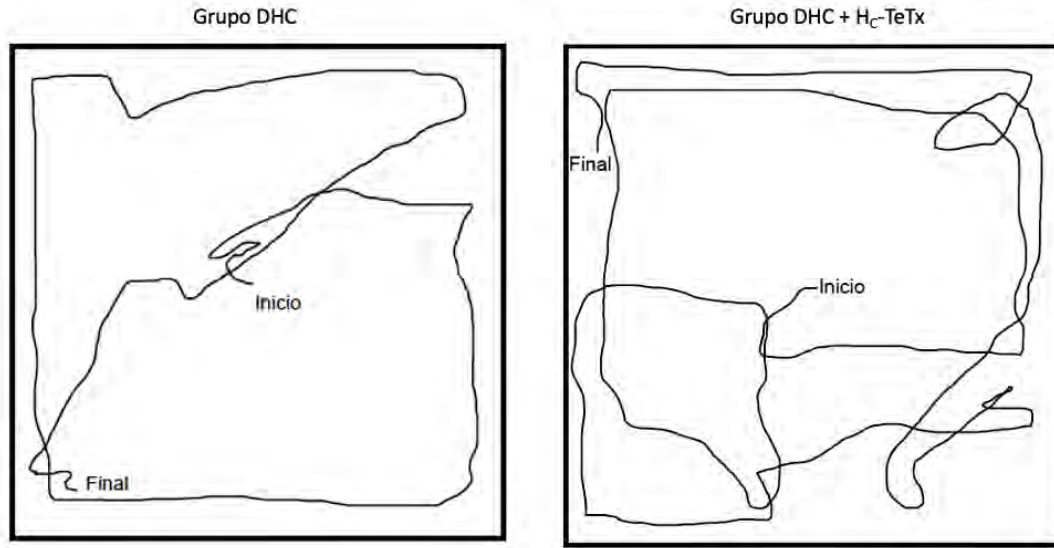


Figura 10-2 Trayectoria recorrida.

Fase 2: Reconocimiento de objetos familiares

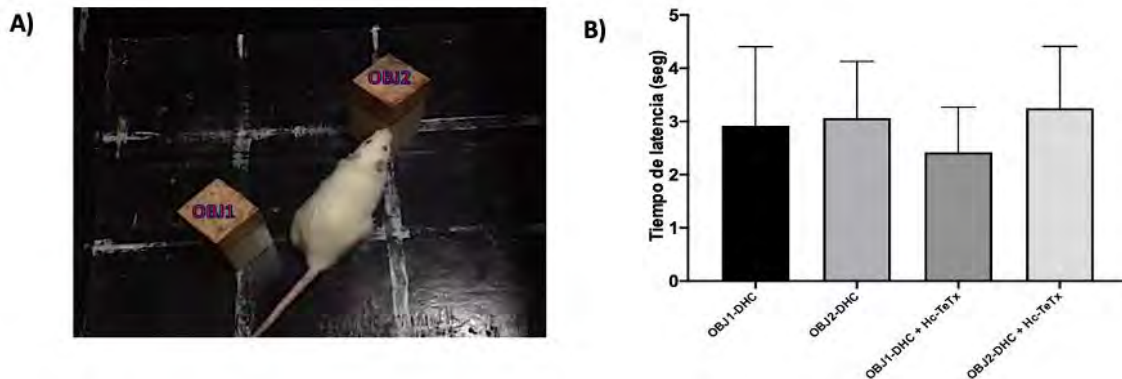


Figura 10-3 Fase 2: Reconocimiento de objetos familiares.

A) Se muestra la distribución de los OBJ1 y OBJ2 en el campo abierto. B) Los datos representan la media de los valores \pm el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. La diferencia en el tiempo de latencia para el OBJ1 y OBJ2, respectivamente en ambos grupos, no fue estadísticamente significativa.

En un periodo de 24 horas después de la fase de habituación, los animales fueron colocados nuevamente en el campo abierto con 2 objetos similares (OBJ1 y OBJ2), para cuantificar el tiempo de exploración a cada objeto. Para el OBJ1, el grupo DHC registró un tiempo de latencia de 2.7 ± 2.28 seg. Mientras que el grupo DHC+HC-TeTx obtuvo un tiempo de latencia de 2.3 ± 1.30 seg. El análisis estadístico indica

que el grupo DHC exploró por más tiempo el OBJ1 con respecto al grupo DHC+Hc-TeTx. Éste último grupo tuvo una disminución del 14.7% ($p= 0.778$) del tiempo de latencia, lo cual no fue estadísticamente significativo (Figura 10-3-B).

Para el OBJ2, se obtuvo un tiempo de latencia de 2.96 ± 1.64 seg. y 3.25 ± 1.75 seg., para el grupo DHC y el grupo DHC+HC-TeTx, respectivamente. Al compararse se identificó un aumento el 9.5% ($p= 0.9266$) del tiempo de latencia en el grupo DHC+HC-TeTx, interpretándose como una diferencia estadísticamente no significativa (Figura 10-3-B).

Fase 3: Reconocimiento de objetos novedosos (memoria a corto plazo)

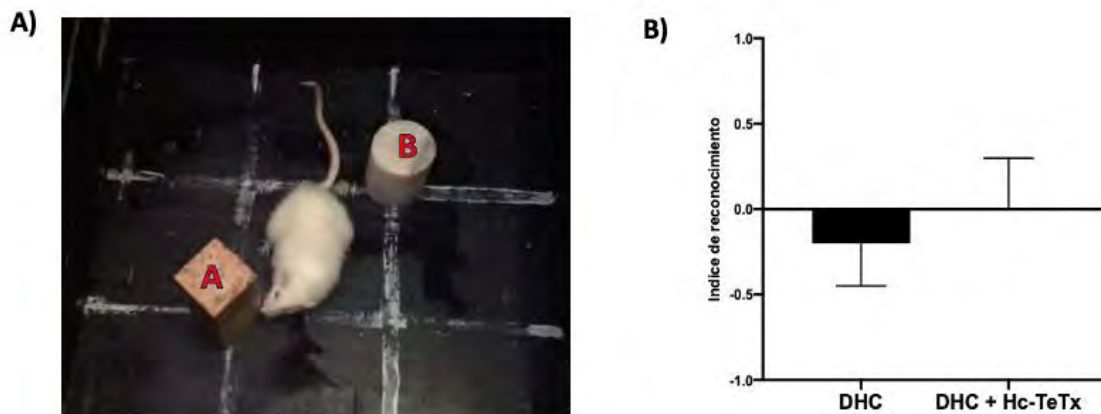


Figura 10-4 Fase 3: Reconocimiento de objetos novedosos y evaluación de memoria a corto plazo.

A) Se muestra la distribución de los objetos A y B dentro del campo abierto. B) Los datos representan la media de los valores \pm el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student, sin embargo, no hubo diferencia significativa en el índice de reconocimiento entre ambos grupos.

Dos horas después de la fase 2, uno de los objetos familiares (OBJ2 de la fase anterior) se cambió por un objeto novedoso (objeto "B" en esta fase) y se permitió nuevamente la exploración durante 5 minutos. En esta ocasión, los resultados obtenidos fueron a través de la fórmula de índice de discriminación (DI): $DI = (TN - TF) / (TN + TF)$, donde TN es tiempo de exploración del "Objeto novedoso" y TF es el tiempo de exploración del "Objeto familiar".

Para el grupo DHC se obtuvo un índice de discriminación de -0.15 ± 0.39 , mientras que para el grupo DHC+HC-TeTx fue de 0.01 ± 0.45 . Al comparar ambos grupos se evidenció en el grupo DHC+HC-TeTx una disminución del 105.9% ($p= 0.8443$) de su índice de reconocimiento. Dicha disminución se considera estadísticamente no significativa (Figura 10-4-B).

Fase 4: Reconocimiento de objetos novedosos (memoria a largo plazo)

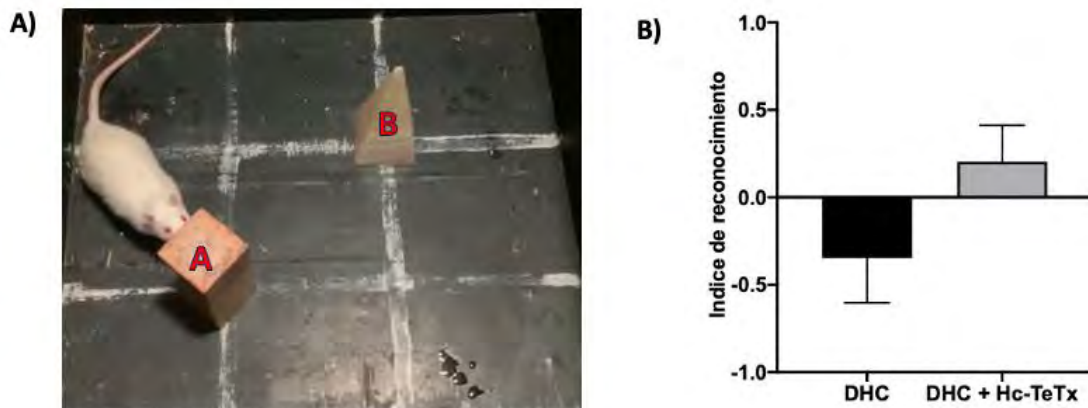


Figura 10-5 Fase 4: Reconocimiento de objetos novedosos y evaluación de memoria a largo plazo.

A) Se muestra la distribución de los objetos A y B dentro del campo abierto. B) Los datos representan la media de los valores \pm el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student, sin embargo, la diferencia del índice de reconocimiento entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa.

Finalmente, la fase 4 donde se valoró la memoria a largo plazo, se realizó 24 horas posteriores a la fase tres, y el objeto novedoso fue remplazado por otro objeto novedoso y se permitió la exploración por 5 minutos. El índice de discriminación fue evaluado nuevamente y se obtuvo un DI de -0.39 ± 0.38 para el grupo DHC y 0.20 ± 0.31 para el grupo DHC+HC-TeTx; siendo este último grupo el que contó con una disminución del 152.4% ($p= 0.0624$) en su índice de reconocimiento. Dicha disminución se considera estadísticamente no significativa (Figura 10-5-B).

10.3. Pruebas bioquímicas

A continuación, en la Tabla 10-2, se muestra el análisis estadístico de las pruebas bioquímicas de ambos grupos experimentales.

Variables bioquímicas	Grupo DHC	Grupo DHC+HC-TeTx
Glucosa basal	166.6 ± 13.82	94.2 ± 3.48
Insulina basal	31.4 ± 3.84	23.3 ± 2.26
HOMA-IR	2.01 ± 0.21	0.92 ± 0.12
HOMA-S%	53.70 ± 7.57	117.34 ± 13.55
HOMA-B	75.32 ± 3.80	44.26 ± 3.33
Fructosamina	75.32 ± 3.80	43.68 ± 3.21
Corticoesterona	10 ± 0.98	11.11 ± 0.71
Adiponectina	82.15 ± 3.41	79.16 ± 4.01
Leptina	3.6 ± 0.36	2.88 ± 0.05
Triglicéridos (TG)	129.2 ± 4.75	94.4 ± 9.21
Ácidos grasos libres (AGL)	14.6 ± 1.64	18.1 ± 1.13
Colesterol	113.34 ± 5.77	97.49 ± 3.02
LDL-c	47.7 ± 3.34	34 ± 2.18
HDL-c	39.8 ± 2.92	45.7 ± 2.04
VLDL-c	25.84 ± 0.95	21.14 ± 1.62

Tabla 10-2 Análisis de valores bioquímicos.

Los datos representan la media de los valores ± el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student.

Las variables bioquímicas del grupo DHC+Hc-TeTx respecto con las del grupo DHC que demostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 10-6) son:

- Glucosa basal: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 43.5% ($p = 0.0103$) respecto al grupo DHC.

- Insulina basal: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 25.8% ($p=0.0230$) respecto al grupo DHC.
- HOMA-IR: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 54.3% ($p=0.0051$) respecto al grupo DHC.
- HOMA S%: El grupo DHC+Hc-TeTx aumentó 118.5% ($p=0.0097$) respecto al grupo DHC.
- HOMA-B: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 41.2% ($p=0.0046$) respecto al grupo DHC.
- Fructosamina: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 42.0% ($p=0.0042$) respecto al grupo DHC.
- Triglicéridos: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 26.9% ($p=0.0073$) respecto al grupo DHC.
- Colesterol: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 14.0% ($p=0.0326$) respecto al grupo DHC.
- LDL-c: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 29.7% ($p=0.0003$) respecto al grupo DHC.
- VLDL-c: El grupo DHC+Hc-TeTx disminuyó 18.2% ($p=0.0493$) respecto al grupo DHC.

Por otro lado, las variables bioquímicas del grupo DHC+Hc-TeTx respecto con las del grupo DHC que demostraron una diferencia estadísticamente no significativa ($p=>0.05$) (Figura 10-6) son:

- Corticoesterona: El grupo DHC+Hc-TeTx aumentó 11.1% ($p=0.4181$) respecto al grupo DHC.

- Adiponectina: El grupo DHC+H_c-TeTx disminuyó 3.6% (p=0.6361) respecto al grupo DHC.
- Leptina: El grupo DHC+H_c-TeTx disminuyó 20.0% (p=0.0883) respecto al grupo DHC.
- AGL: El grupo DHC+H_c-TeTx aumentó 24% (p=0.1272) respecto al grupo DHC.
- HDL-c: El grupo DHC+H_c-TeTx aumentó 14.8% (p=0.1316) respecto al grupo DHC.

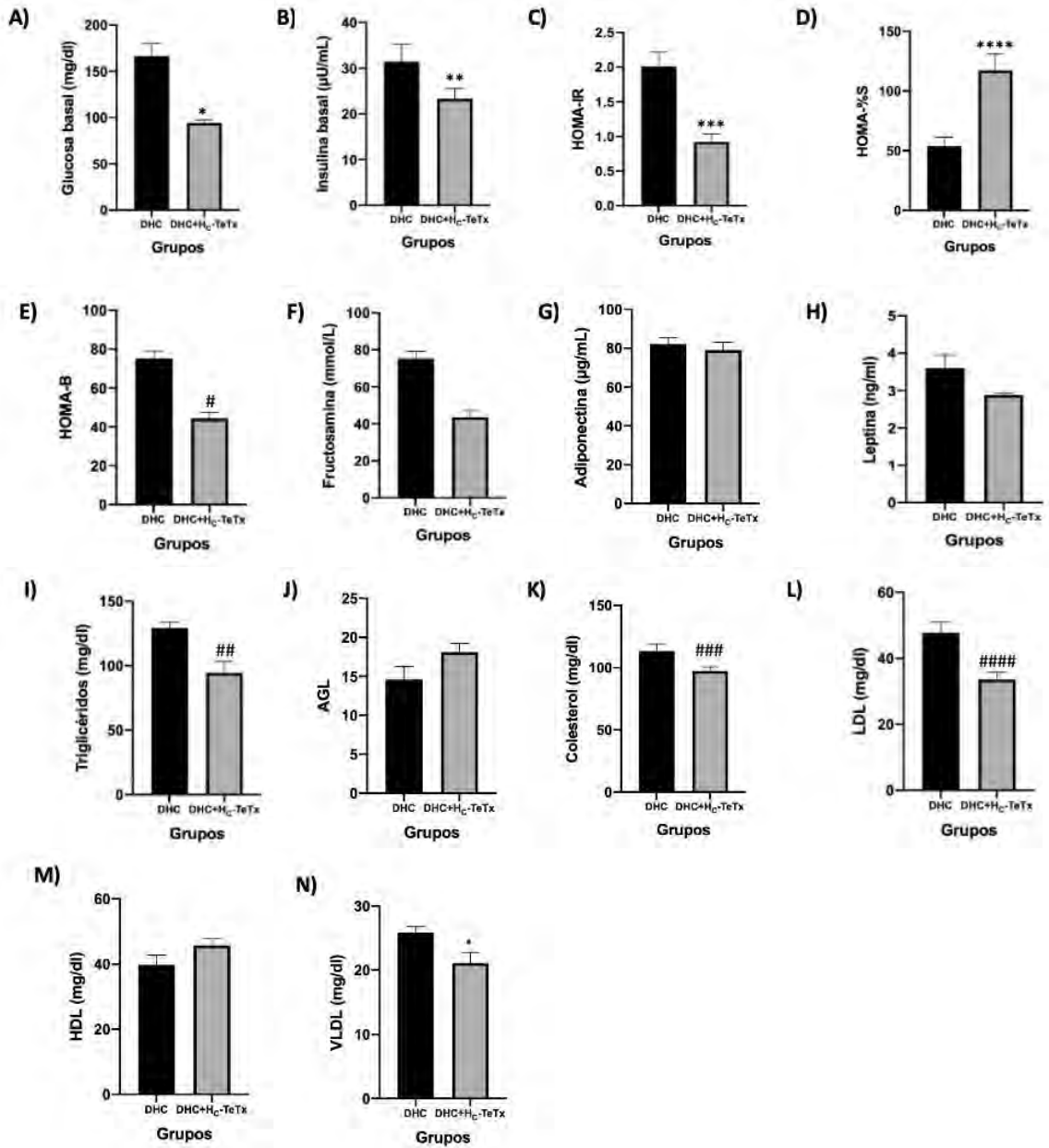


Figura 10-6 Efecto de la administración de la Hc-TeTx sobre los parámetros bioquímicos.

Los datos representan la media de los valores \pm el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. * $p=0.0103$, ** $p=0.0230$, *** $p=0.0051$, **** $p=0.0097$, # $p=0.0046$, ## $p=0.0073$, ### $p=0.0326$, #### $p=0.0003$, · $p=0.0493$.

10.4. Variables de estrés oxidativo e inflamación

Las variables para demostrar estrés oxidativo e inflamación se muestran en la Tabla 10-3 y su comparación gráfica en las Figura 10-7 y Figura 10-8 , respectivamente.

Variables	Grupo DHC	Grupo DHC+HC-TeTx	Análisis	Diferencia
ROS	0.29 ± 0.02	0.23 ± 0.03	El grupo DHC+HC-TeTx disminuyó 20% (p= 0.1331) respecto con el grupo DHC.	NO SIGNIFICATIVA
Liperoxidación	0.30 ± 0.01	0.22±0.01	El grupo DHC+HC-TeTx disminuyó 26% (p= 0.0080) respecto con el grupo DHC.	SIGNIFICATIVA
Catalasa	0.67±0.01	0.32±0.01	El grupo DHC+HC-TeTx disminuyó 52% (p= 0.0006) respecto con el grupo DHC.	SIGNIFICATIVA
SOD	9.18±0.39	6.98±0.19	El grupo DHC+HC-TeTx disminuyó 24% (p= 0.0195) respecto con el grupo DHC.	SIGNIFICATIVA
IL-1β	97.19±0.90	57.06±0.66	El grupo DHC+HC-TeTx disminuyó 41% (p= 0.0000) respecto con el grupo DHC.	SIGNIFICATIVA
TNF-α	218.35±7.58	151.01±1.40	El grupo DHC+HC-TeTx disminuyó 31% (p= 0.0028) respecto con el grupo DHC.	SIGNIFICATIVA

Tabla 10-3 Parámetros de estrés oxidativo e inflamación.

Los datos representan la media de los valores ± el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de “t” de Student.

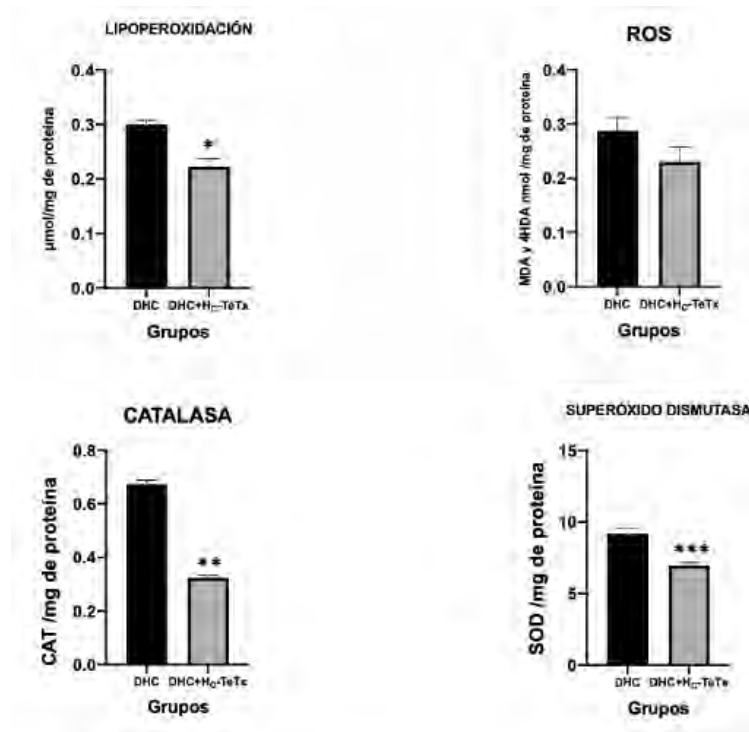


Figura 10-7 Variables de estrés oxidativo.

Los datos representan la media de los valores \pm el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. * p= 0.0080, ** p= 0.0006, *** p= 0.0195.

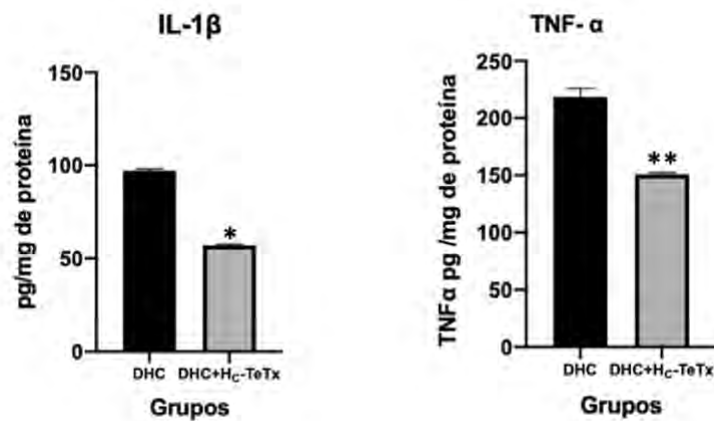


Figura 10-8 Variables de inflamación.

Los datos representan la media de los valores \pm el SEM (Error Estándar de la Media) y las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. * p= 0.0000, ** p= 0.0028.

11. Discusión

En el presente trabajo se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar y se organizaron en 2 grupos: grupo control (DHC o dieta hipercalórica) y grupo experimental (DHC + HC-TeTx). A éste último, a los 18 meses, se le administró vía intramuscular el fragmento HC-TeTx en 3 ocasiones a una concentración de 0.05 mg/kg de peso para determinar su efecto sobre los parámetros zoométricos, conductas motoras y variables bioquímicas.

Es importante mencionar que la inducción por 18 meses al síndrome metabólico de los sujetos experimentales a través de la administración de la DHC (Dieta PicoLab® Rodent Diet 20 5053), demostró un incremento en ambos grupos del peso corporal, talla, perímetro abdominal, IMC e índice de Lee. Sin embargo, a pesar que el grupo DHC+HC-TeTx presentó el mayor aumento en dichos parámetros (9.3% ($p=0.0607$) de peso, 0.7% ($p=0.5663$) de talla, 4.6% ($p=0.0434$) de perímetro abdominal, 8% ($p=0.3313$) de IMC y 4.4% ($p=0.0632$) de índice de Lee), éstos no fueron estadísticamente significativos, a excepción del perímetro abdominal que fue la única variable que demostró una diferencia significativa (32.3 ± 0.17 vs 33.7 ± 0.70 ; $p=0.0434$). Los resultados coinciden con los reportados por Treviño y colaboradores en 2017 y Díaz y colaboradores en 2018, sobre modelos experimentales inducidos a un estado de síndrome metabólico con una dieta hipercalórica parecida a la aquí utilizada.

Respecto a las variables bioquímicas, éstas demostraron un incremento en ambos grupos similar a lo observado en modelos de síndrome metabólico. Aunque, de forma específica, el grupo DHC + HC-TeTx con respecto al grupo control, demostró una disminución estadísticamente significativa en los siguientes parámetros: 43.5% ($p=0.0103$) en la glucosa basal, 25.8% ($p=0.0230$) en la insulina basal, 54.3% ($p=0.0051$) en el HOMA-IR, 41.2% ($p=0.0046$) en el HOMA-B, 42.0% ($p=0.0042$) en la fructosamina, 26.9% ($p=0.0073$) en los triglicéridos, 14.0% ($p=0.0326$) en el colesterol, 29.7% ($p=0.0003$) en LDL-c, 18.2% ($p=0.0493$) en el VLDL-C. Estos resultados evidencian el efecto del fragmento HC-TeTx sobre la mejora de parámetros bioquímicos en comparación con modelos sin la administración de dicho

fragmento. De igual manera, los resultados sobre los parámetros bioquímicos son similares a los presentados por Treviño y colaboradores y Díaz y colaboradores.

Es importante mencionar que en la actualidad las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son consideradas como un reto para la salud pública a nivel mundial (OMS, 2018, Yiengprugsawan, VS., et al.; 2019). Incluido el síndrome metabólico. Asimismo, se han posicionado como las principales causas de muerte a partir de 2016, por encima de las enfermedades transmisibles, en los países de ingresos bajos, medianos y altos (Yiengprugsawan, VS., et al.; 2019; Peters, R., et al. 2019). Es de importancia mencionar que dentro de las ECNT también se incluyen trastornos neurológicos como la EA y otros tipos de demencia (Yiengprugsawan, VS., et al.; 2019, Peters, R., et al; 2019). Por esta razón y debido a que el envejecimiento es el mayor factor de riesgo para la mayoría de las ECNT, se han desarrollado estrategias para la reducción del riesgo y prevención de éstas enfermedades; y de esta manera promover un envejecimiento saludable (Peters, R., et al. 2019, Wahl, D., et al.; 2019).

Debido a la problemática anteriormente expuesta, en los últimos años se ha investigado el impacto negativo que tiene uno de los hábitos más comunes hoy en día: el consumo de alimentos ricos en grasa saturadas; sobre la salud física y las funciones cognitivas con principal interés en áreas cerebrales cuyo rol es crucial para la formación del aprendizaje y la consolidación de la memoria. De igual manera, se ha investigado el impacto que tiene el consumo de grasas sobre la inducción de procesos oxidativos e inflamatorios en el organismo, incluido el nivel cerebral (Tan, B. L. et al.; 2019).

Por lo tanto, una vez presente el estado de síndrome metabólico y envejecimiento en ambos grupos experimentales, se realizó la prueba NORT con el fin de demostrar el efecto de la administración del fragmento HC-TeTx sobre la modificación en la conducta a corto y largo plazo.

Los resultados demostraron en la fase 1 (habitación y evaluación de actividad motora) que el grupo DHC+HC-TeTx tuvo una disminución respecto con el grupo

control (DHC) en la relación total de cuadros visitados del 16.1% ($p=0.080$) y en el número total de levantamientos del 22.2% ($p=0.362$), sin embargo, no fueron estadísticamente significativos. Veinticuatro horas posteriores, se realizó la fase 2 (reconocimiento de objetos familiares) en la cuál el análisis estadístico indicó que el grupo DHC (2.7 ± 2.28 seg) exploró por más tiempo el OBJ1 con respecto al grupo DHC+HC-TeTx (2.3 ± 1.30 seg), sin embargo, la diferencia entre ambos tiempos de latencia no fue estadísticamente significativa. No obstante, el tiempo de latencia para el OBJ2 aunque aumento 9.5% ($p=0.9266$) en el grupo DHC+HC-TeTx respecto con el DHC, éste tampoco fue estadísticamente significativo. Dos horas posteriores a la finalización de la segunda fase, se realizó la fase 3 (reconocimiento de objetos novedosos) para analizar la memoria a corto plazo de cada grupo experimental. En ésta fase se determinó el índice de discriminación (DI) de cada grupo (a través de la fórmula $DI = (TN-TF)/(TN + TF)$), obteniendo una disminución no significativa del 105.9% ($p=0.8443$) en el índice de discriminación del grupo DHC+HC-TeTx respecto con el DHC. Finalmente, veinticuatro horas después se realizó la cuarta fase donde se evaluó la memoria a largo plazo de cada animal. El DI fue evaluado nuevamente y se obtuvo un DI de -0.39 ± 0.38 para el grupo DHC y 0.20 ± 0.31 para el grupo DHC+HC-TeTx; siendo este último grupo el que contó con una disminución del 152.4% ($p= 0.0624$) en su índice de reconocimiento. Dicha disminución se considera estadísticamente no significativa. Los resultados anteriormente expuestos demuestran que un estado de síndrome metabólico causan alteraciones en las memorias tanto a corto como largo plazo. De igual manera esto ha sido demostrado por Treviño y colaboradores (Treviño et al., 2017). Por otra parte, la disminución no significativa en el DI del grupo DHC+HC-TeTx respecto con el grupo DHC, se traduce en que la administración del HC-TeTx es capaz de mejorar el deterioro en las memorias tanto a corto como a largo plazo inducido por los estados de síndrome metabólico y envejecimiento. Es importante mencionar que en un estudio realizado por Vazquez-Roque y colaboradores en donde se utilizaron ratones machos de 18 meses de la cepa CD-1, sus resultados demostraron que la administración del fragmento Hc-TeTx probablemente reduce la intensidad de los procesos neurodegenerativos y favorece la supervivencia y el

crecimiento neuronal. Y de esta forma, podría ser capaz de reducir el daño neuronal presente en condiciones de envejecimiento (Vazquez-Roque et al., 2020).

Por otro lado, otro de los puntos más importantes que se han investigado en el campo de la neurociencia es el rol que juega la inflamación sistémica de bajo grado (ISBG) y el estrés oxidativo presentes tanto en el envejecimiento como en el síndrome metabólico y su participación en el desarrollo y/o exacerbación de diversas enfermedades que afectan directamente al tejido cerebral.

Para lo anterior es de relevancia comprender en primer lugar que los procesos de inflamación son considerados como un sistema de defensa inmunológica esencial para cada organismo con el fin de restaurar la homeostasis de este y garantizar su supervivencia (Rodríguez-Hernández, H. et al; 2013); y generalmente son autolimitados. Sin embargo, en procesos fisiológicos como el envejecimiento uno de los principales cambios que sucede en el organismo es la desregulación de la respuesta inmunitaria, que conduce a un estado inflamatorio sistémico crónico el cuál es capaz de exacerbar al mismo proceso de envejecimiento y las ECNT relacionadas con éste (Chung, H. Y. et al.; 2019). Del mismo modo, en procesos patológicos como la obesidad se han documentado estados persistentes y altamente deletéreos de ISBG; esto debido a que la hipertrofia por la que cursan los adipocitos los hace capaces de generar una mayor producción de adipocinas, quimiocinas y citocinas proinflamatorias (Castro, A.M. et al.; 2017). En segundo lugar, el alto consumo de grasas contribuye a la aparición de un estado de obesidad en donde factores como la hiperglucemia, los niveles elevados de lípidos, deficiencias de vitaminas y minerales, el estado de inflamación crónico, el incremento de los niveles de leptina, la actividad muscular aumentada para soportar un peso excesivo, la disfunción endotelial, la función mitocondrial alterada, entre otros; han demostrado ser posibles contribuyentes de los niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y citocinas pro-inflamatorias (Manna, P. et al.; 2015, Tan, B. L. et al.; 2019).

Las neuronas y las células de la microglia (astrocitos) son en gran parte responsables del consumo masivo de oxígeno y glucosa por parte del cerebro; de

hecho, aunque el tejido cerebral representa sólo alrededor del 2% del peso corporal total, éste consume más del 20% del consumo total de oxígeno del organismo (Gandhi, S. et al; 2012). En situaciones no patológicas y en cantidades moderadas o bajas, los ROS se consideran esenciales para el desarrollo y la función de las neuronas; y los posibles efectos negativos de su producción son neutralizados por sistemas antioxidantes como: superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y catalasa (CAT); y de esta manera el cerebro es capaz de regular eficazmente su consumo de oxígeno y su capacidad de generación Redox (Salim S. 2017). Otro dato de interés es que el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) generados por los radicales libres de oxígeno (ROS) promueven funciones fisiológicas importantes, como la LTP a través de mecanismos dependientes del glutamato (Salim S.; 2017). Sin embargo, ante la presencia del desequilibrio entre la producción de ROS y el nivel de antioxidantes, los ROS son capaces de causar oxidación de proteínas, ADN, ARN o peroxidación de lípidos, y de conducir a muerte neuronal (Gandhi, S. et al; 2012; Tan, B. L. et al.; 2019). Por otro lado, los productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente el ácido araquidónico y el ácido docosahexanoico, que abundan en el cerebro, son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Por lo que, en diferentes estudios, las concentraciones altas de 4-HNE por unidad de triglicéridos intramusculares en pacientes obesos han sido útiles para demostrar la presencia de procesos de estrés oxidativo (Gandhi, S. et al; 2012; Manna, P. et al.; 2015)

En relación con lo anterior, el análisis realizado en este trabajo de los parámetros de estrés oxidativo e inflamación mostró en el grupo DHC+HC-TeTx, en comparación con el grupo DHC, una disminución estadísticamente significativa en los siguientes parámetros: lipoperoxidación (disminuyó 26%, $p= 0.0080$), catalasa (CAT) (disminuyó 52%, $p= 0.0006$), superóxido dismutasa (SOD) (disminuyó 24%, $p= 0.0195$), IL-1 β (disminuyó 41%, $p= 0.0000$) y TNF- α (disminuyó 31%, $p= 0.0028$). Aunque también hubo una disminución en las especies reactivas de oxígeno (ROS) representadas por MDA y 4HDA en el grupo DHC+HC-TeTx de 20% ($p= 0.1331$) respecto con el grupo DHC, esta no fue considerada como estadísticamente

significativa. Estos resultados sugieren la posible participación del fragmento HC-TeTx en contrarrestar los efectos deletéreos resultantes del síndrome metabólico y el envejecimiento. Además, un estudio realizado por Moreno-Galarza y colaboradores en donde se administró vía intraestriatal el neurotóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) en ratas macho cepa Sprague Dawley, se demostró que el fragmento Hc-TeTx tiene la capacidad de evitar la degeneración dopaminérgica estriatal desencadenada por el estrés oxidativo producido por MPP+. Esto a su vez, se menciona que podría ser explicado por la acción de Hc-TeTx en el mantenimiento del equilibrio natural de las células entre oxidantes y antioxidantes mediante la regulación de la expresión de genes relacionados con la activación del factor de transcripción Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor) y la translocación nuclear, donde Nrf2 se une en el elemento de respuesta antioxidante (ARE) para regular genes antioxidantes, como SOD, catalasa o glutatión peroxidasa (Moreno-Galarza et al., 2018).

En resumen, nuestros resultados sugieren que la administración HC-TeTx mejora la memoria de reconocimiento de corto y largo plazo en condiciones de síndrome metabólico y envejecimiento, además de disminuir marcadores de estrés oxidativo e inflamación. Debido a esto, el fragmento HC-TeTx podría ser considerado como una alternativa terapéutica tanto para los efectos negativos del envejecimiento sobre las funciones cognitivas como para aquellos ocasionados por las ECNT.

12. Conclusiones

La administración intramuscular del fragmento Hc-TeTx:

- No demostró diferencias estadísticamente significativas en la actividad motora (valorada por número total de cuadros visitados y levantamientos) de los animales inoculados con este fragmento en comparación con el grupo control.
- No demostró diferencias estadísticamente significativas en las variables zoométricas. Sin embargo, sí hubo una disminución estadísticamente significativa en diversos parámetros bioquímicos (glucosa basal e insulina basal, HOMA-IR, HOMA-B%, fructosamina, triglicéridos, colesterol, LDL-c y VLDL-c), lo que sugiere su posible capacidad de modular a la baja las alteraciones bioquímicas resultantes de un estado de síndrome metabólico y envejecimiento.
- Demostró de manera significativa contribuir con la disminución de los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo (lipoperoxidación, CAT y SOD) e inflamación (IL-1 β y TNF- α); lo que sugiere su posible participación en contrarrestar los efectos deletéreos resultante del síndrome metabólico y el proceso de envejecimiento.

13. Anexos

13.1. Cronograma de actividades (Original)

UDLAP

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Protocolo de investigación



"Efecto de la administración del fragmento C-terminal de la TeTx sobre la estructura y función de neuronas hipocámpales en un modelo de envejecimiento con síndrome metabólico"

Alumna: Ortiz Flores Itzel (ID: 152340)

Director experto: D.C. Alfonso Daniel Díaz Fonseca (Investigador FCQ BUAP) | **Director metodológico:** Dr. Roberto Carlos Mares Morales

Universidad de las Américas Puebla y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Periodo: Julio de 2020 – Junio de 2021

No.	Actividades	Julio 2020				Agosto 2020				Septiembre 2020				Octubre 2020				Noviembre 2020				Diciembre 2020			
		Semanas				1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Inducción dietaria del modelo murino (Total: 18 meses)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
2	Cuantificación de ingesta de alimento					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
3	Zoometría*									x															
4	Pruebas conductuales (NORT)																					x	x	x	x
5	Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)																								

No.	Actividades	Enero 2021				Febrero 2021				Marzo 2021				Abril 2021				Mayo 2021				Junio 2021				Julio 2021			
		Semanas				1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	Obtención y envío de muestras sanguíneas****	x	x	x																									
7	Eutanasia				x																								
8	Pruebas histológicas					x	x	x	x																				
9	Pruebas de inmunohistoquímica									x	x	x	x																
10	Análisis y reporte de Pruebas conductuales													x	x	x	x												
11	Análisis de determinaciones bioquímicas*****																	x	x	x	x								
12	Integración de resultados a la base de datos del protocolo de investigación																					x	x	x	x	x			

*Zoometría: Comprende el peso corporal, talla (longitud total), perímetro abdominal, índice de masa corporal (IMC).

**Pruebas conductuales: Se realizan a partir de los 18 meses de edad y se evaluarán las conductas de actividad motora, memoria y ansiedad por medio de la Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT).

***NORT: Prueba de reconocimiento de objetos novedosos.

****Se enviarán las muestras sanguíneas a un laboratorio seleccionado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para su procesamiento.

*****Determinaciones bioquímicas: Es decir, el análisis de las concentraciones de glucosa, lípidos (triglicéridos, colesterol y lípidos totales) y lipoproteínas séricas (LDL-C, HDL-C y VLDL-C) en cada modelo murino. Así como su reporte.

13.2. Cronograma de actividades (Modificado a contingencia sanitaria)

A continuación, se presenta un *Cronograma de actividades modificado* a seguir en caso de que el semáforo de riesgo epidemiológico para la actual pandemia por SARS-CoV-2 (COVID-19) no se encuentre en “Verde” (riesgo epidémico poblacional bajo) a partir de Enero 2021.



CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES MODIFICADO

Protocolo de investigación

"EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA TETX SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE NEURONAS HIPOCAMPALES EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO CON SÍNDROME METABÓLICO"

Alumna: Ortiz Flores Itzel (ID: 152340)

Director experto: D.C. Alfonso Daniel Díaz Fonseca (Investigador FCQ BUAP) | Director metodológico: Dr. Roberto Carlos Mares Morales

Universidad de las Américas Puebla y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Periodo: Enero 2021 – Junio de 2021



El siguiente cronograma de actividades se llevará a cabo únicamente si el semáforo de riesgo epidemiológico no se encuentra en "Verde" (riesgo epidémico poblacional bajo) a partir de Enero 2021.

No.	Actividades	Enero 2021				Febrero 2021				Marzo 2021				Abril 2021				Mayo 2021				Junio 2021				Julio 2021			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	Semanas																												
1	Eutanasia	x	x																										
2	Obtención y envío de muestras sanguíneas*		x	x	x																								
3	Análisis y reporte de Pruebas conductuales**					x	x	x	x																				
4	Análisis de determinaciones bioquímicas***									x	x	x	x	x															
5	Integración de resultados a la base de datos del protocolo de investigación																	x	x	x	x	x	x	x	x				

*Se enviarán las muestras sanguíneas a un laboratorio seleccionado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para su procesamiento.

**Pruebas conductuales: Se realizan a partir de los 18 meses de edad y se evaluarán las conductas de actividad motora, memoria y ansiedad por medio de la Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT).

***Se enviarán las muestras sanguíneas a un laboratorio seleccionado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para su procesamiento.

NOTA: En caso de llevar a cabo lo establecido en este cronograma, se reportará en el apartado de "Resultados" que los objetivos tanto general como específicos de este proyecto de investigación no se pudieron llevar a cabo por completo debido a la pandemia actual y a lo establecido por la Secretaría de Salud de México en su documento "Lineamiento para la estimación de riesgos del semáforo por regiones COVID-19", disponible en: https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2020/10/SemaforoCOVID_Metodo.pdf

13.3. Comprobante del CICUAL



BUAP

**AL COMITÉ DE ÉTICA
UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA (UDLAP)
PRESENTE:**

Por medio de la presente le comunico que el proyecto de investigación intitulado "Efecto de la administración del fragmento C-terminal de la TeTx sobre la estructura y función de neuronas hipocámpales en un modelo de envejecimiento con síndrome metabólico", ha sido aceptado por el comité de Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), al cumplir con los requerimientos y normatividad vigente.

Sin más por el momento, se extiende la presente con fines que al interesado convengan.

ATENTAMENTE
"pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Zaragoza. A 3 de diciembre de 2020

Dr. Samuel Treviño Mora
Secretario de Investigación



Facultad de Ciencias Químicas

Edif. 105I, Ciudad Universitaria
Col. San Mamel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
Tel. (01- 222) 229-55-00 Ext. 7397

13.4. Bioseguridad

En relación con los lineamientos de bioseguridad dentro de los “Laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, al final de este documento se anexa el “Instructivo para la regulación de los servicios e instalaciones” en donde se podrá encontrar las recomendaciones para llevar un control adecuado de los reactivos y material de laboratorio.

14. Referencias

Aguilar-Salinas, C. A., & Viveros-Ruiz, T. (2019). Recent advances in managing/understanding the metabolic syndrome. *F1000Research*, 8, 370. doi:10.12688/f1000research.17122.1

Aguirre Siancas, Elías. (2015). La función del hipocampo en el procesamiento de la memoria y su deterioro durante el envejecimiento. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 16. 21-30. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/297736958_La_funcion_del_hipocampo_en_el_procesamiento_de_la_memoria_y_su_deterioro_durante_el_envejecimiento

Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., ... Smith, S. C. (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120(16), 1640–1645. doi:10.1161/circulationaha.109.192644

Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research*, 163, 3–22. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)

Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H.-Y., Ahima, R. S., ... Nathan, D. M. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews Neurology*, 14(3), 168–181. Disponible en: doi:10.1038/nrneurol.2017.185

Barba Evia, J.R. (2018) “México y el reto de las enfermedades crónicas no transmisibles. El laboratorio también juega un papel importante”. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. Vol 65 (1): 4-17. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2018/pt181a.pdf>

Bettio, L. E. B., Rajendran, L., & Gil-Mohapel, J. (2017). The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 79, 66–86. Disponible en: doi:10.1016/j.neubiorev.2017.04.030

Booker, S. A., & Vida, I. (2018). Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell and Tissue Research*. Disponible en: doi:10.1007/s00441-018-2882-2

Brunk S, Swanson J. (1981) Colorimetric method for free fatty acids in serum validated by comparison with gas chromatography. *Clin Chem*. 27(6):924-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/clinchem/27.6.924>

Cabrera-Vásquez S. (2007) El control neurotrófico en el desarrollo y la función de dos órganos endocrinos. *Rev Invest Clin*. Vol. 59 (3): 219-228. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2007/nn073h.pdf>

Calvo, A. C., Oliván, S., Manzano, R., Zaragoza, P., Aguilera, J., & Osta, R. (2012). Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6883–6901. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms13066883>

- Castro**, A. M., Macedo-de la Concha, L. E., & Pantoja-Meléndez, C. A. (2017). Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 80(2), 101–105. doi:10.1016/j.hgmx.2016.06.011
- Chapeton-Montes**, D., Plourde, L., Bouchier, C. et al. (2019) The population structure of *Clostridium tetani* deduced from its pan-genome. *Sci Rep* 9, 11220. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47551-4>
- Chiaranai**, C; Chularee, S; Srithongluang, S. (2018). Older people living with chronic illness. *Geriatric Nursing*. Vol. 39. Disponible en: 10.1016/j.gerinurse.2018.02.004.
- Chung**, H. Y., Kim, D. H., Lee, E. K., Chung, K. W., Chung, S., Lee, B., Seo, A. Y., Chung, J. H., Jung, Y. S., Im, E., Lee, J., Kim, N. D., Choi, Y. J., Im, D. S., & Yu, B. P. (2019). Redefining Chronic Inflammation in Aging and Age-Related Diseases: Proposal of the Senoinflammation Concept. *Aging and disease*, 10(2), 367–382. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0324>
- Ciriza**, J., García-Ojeda, M., Martín-Burriel, I., Agulhon, C., Miana-Mena, F., Muñoz, M., Osta, R. (2008). Antiapoptotic activity maintenance of Brain Derived Neurotrophic Factor and the C fragment of the tetanus toxin genetic fusion protein. *Open Life Sciences*, 3(2). Disponible en: doi:10.2478/s11535-008-0011-z
- Córdova Villalobos**, José & Meléndez, Jorge & Lara-Esqueda, Agustín & Barquera, Simón & Peralta, Martín & Hernandez-Avila, Mauricio & May, María & Aguilar-Salinas, Carlos. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México*, ISSN 0036-3634, Vol. 50, N°. 5, 2008, pags. 419-427. 50. Disponible en: 10.1590/S0036-36342008000500015.
- Coutureau**, E., & Di Scala, G. (2009). Entorhinal cortex and cognition. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 753–761. Disponible en: doi:10.1016/j.pnpbp.2009.03.038
- Cubí**, R., Candalija, A., Ortega, A., Gil, C., & Aguilera, J. (2013). Tetanus Toxin Hc Fragment Induces the Formation of Ceramide Platforms and Protects Neuronal Cells against Oxidative Stress. *PLoS ONE*, 8(6), e68055. doi:10.1371/journal.pone.0068055
- D. Sehna**, A.S. Rose, J. Kovca, S.K. Burley, S. Velankar (2018) THE HC FRAGMENT OF TETANUS TOXIN COMPLEXED WITH SIALIC ACID. *Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education*. Disponible en: rscb.org/3d-view/1DFQ/1
- Díaz**, A., Escobedo C., Treviño S., Chávez R., Lopez-Lopez G., Moran C., Guevara J., Venegas B., Muñoz-Arenas G. (2018) Metabolic Syndrome Exacerbates the Recognition Memory Impairment and Oxidative-Inflammatory Response in Rats with an Intrahippocampal Injection of Amyloid Beta 1–42. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/1358057>
- Durán**, A., Valderrama L., Uribe A. F. González A., Molina J. M. (2010) Enfermedad crónica en adultos mayores. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*, Vol. 51 (1): 16-28, pp. 16-28. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2310/231018676003.pdf>
- Gandhi**, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–11. doi:10.1155/2012/428010
- George** EK, De Jesus O, Vivekanandan R. (2020) *Clostridium Tetani*. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482484/>

- Guerra, F., & Bucci, C.** (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells*, 5(3), 34. <https://doi.org/10.3390/cells5030034>
- Gulyaeva, N. V.** (2018). Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. *Neurochemical Research*. Disponible en: [doi:10.1007/s11064-018-2662-0](https://doi.org/10.1007/s11064-018-2662-0)
- Gutiérrez-Rodelo C, et al.** (2017). "Mecanismos moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una actualización". *Gaceta Médica de México*. Vol. 153: 214-228.
- Halpern, J. L., & Neale, E. A.** (1995). Neurospecific Binding, Internalization, and Retrograde Axonal Transport. *Clostridial Neurotoxins*, 221–241. [doi:10.1007/978-3-642-85173-5_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85173-5_10)
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A.** (2017). El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología*, 32(8), 533–539. [doi:10.1016/j.nrl.2015.06.011](https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.011)
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F.** (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*, 24, 677–736. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huang, P. L.** (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 2(5-6), 231–237. Disponible en: [doi:10.1242/dmm.001180](https://doi.org/10.1242/dmm.001180)
- INEGI, INSP, Secretaría de Salud** (2018). "Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. Presentación de resultados". Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- International Diabetes Federation (IDF)** (2019) IDF DIABETES ATLAS, Ninth edition. Disponible en: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf
- Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F., & Carreira, M. C.** (2019). Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later?. *Nutrients*, 11(11), 2704. <https://doi.org/10.3390/nu11112704>
- Jeffery LA, Karim S.** (2020) Botulism. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459273/>
- Kämpfen, F., Wijemunige, N. & Evangelista, B.** (2018) Aging, non-communicable diseases, and old-age disability in low- and middle-income countries: a challenge for global health. *Int J Public Health* 63, 1011–1012. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00038-018-1137-z>
- Karp, G., & Araiza Martinez, M. E.** (2014). *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos* / Gerald Karp. 7a ed, págs: 125-126. México D.F.: McGraw- Hill.
- Kaur, J.** (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 1–21. [doi:10.1155/2014/943162](https://doi.org/10.1155/2014/943162)
- Kellar D., et al.** (2020) Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *The Lancet Neurology*. Vol 19 (9): 758-766. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30231-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30231-3)

Kim, B., & Feldman, E. L. (2012). Insulin resistance in the nervous system. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(3), 133–141. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.12.004>

Klempin, F., Kempermann, G. (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, Vol. 257(5), 271–280. Disponible en: [doi:10.1007/s00406-007-0731-5](https://doi.org/10.1007/s00406-007-0731-5)

Kolter, Thomas. (2012). *Ganglioside Biochemistry*. ISRN Biochemistry. 2012. 506160. Disponible en: [10.5402/2012/506160](https://doi.org/10.5402/2012/506160).

Kozlov, E. M., Grechko, A. V., Chegodaev, Y. S., Wu, W.-K., & Orekhov, A. N. (2020). Contribution of Neurotrophins to the Immune System Regulation and Possible Connection to Alcohol Addiction. *Biology*, vol. 9(4), 63. Disponible en: [doi:10.3390/biology9040063](https://doi.org/10.3390/biology9040063)

Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., & Schiavo, G. (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends in microbiology*, 11(9), 431–437. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00210-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00210-5)

Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., & Schiavo, G. (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends in Microbiology*, 11(9), 431–437. [doi:10.1016/s0966-842x\(03\)00210-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00210-5)

Leal, G., Comprido, D., & Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76, 639–656. [doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.005](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005)

Lee, A. R., Kim, J. H., Cho, E., Kim, M., & Park, M. (2017). Dorsal and Ventral Hippocampus Differentiate in Functional Pathways and Differentially Associate with Neurological Disease-Related Genes during Postnatal Development. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 331. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00331>

Lee, MK., Han, K., Kim, M.K. et al. (2020) Changes in metabolic syndrome and its components and the risk of type 2 diabetes: a nationwide cohort study. *Sci Rep* 10, 2313. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59203-z>

Leff, P. et al (2002) Understanding the neurobiological mechanisms of learning and memory: memory systems of the brain, long term potentiation and synaptic plasticity. Part III B. *Salud Mental*, Vol. 25, No. 4. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/salmen/sam-2002/sam024h.pdf>

León-Pedroza JI, et al. (2015) Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.041>

Li, Y., Aoki, R., & Dolly, J. O. (1999). Expression and characterisation of the heavy chain of tetanus toxin: reconstitution of the fully-recombinant dichain protein in active form. *Journal of biochemistry*, 125(6), 1200–1208. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022404>

Lu, Y., Christian, K., & Lu, B. (2008). BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?. *Neurobiology of learning and memory*, 89(3), 312–323. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.018>

Lu, Y., Christian, K., & Lu, B. (2008). BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?. *Neurobiology of learning and memory*, Vol. 89(3), 312–323. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.018>

Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metabolic syndrome and related disorders*, 13(10), 423–444. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>

Manning, K. A., Erichsen, J. T., & Evinger, C. (1990). Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin. *Neuroscience*, 34(1), 251–263. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90319-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90319-y)

Masuyer, G., Conrad, J., & Stenmark, P. (2017). The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics. *EMBO reports*, 18(8), 1306–1317. Disponible en: <https://doi.org/10.15252/embr.201744198>

Mendieta, L., Bautista, E., Sánchez, A., Guevara, J., Herrando-Grabulosa, M., Moran, J., ... Limón, I. D. (2012). The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine. *Neuroscience Research*, 74(2), 156–167. doi:10.1016/j.neures.2012.08.006

Mendieta, L., Venegas, B., Moreno, N., Patricio, A., Martínez, I., Aguilera, J., & Limón, I. D. (2009). The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP+-lesions. *Neuroscience Research*, 65(1), 98–106. doi:10.1016/j.neures.2009.06.001

Moreno-Galarza, N., Mendieta, L., Palafox-Sánchez, V., Herrando-Grabulosa, M., Gil, C., Limón, D. I., & Aguilera, J. (2018). Peripheral Administration of Tetanus Toxin Hc Fragment Prevents MPP+ Toxicity In Vivo. *Neurotoxicity Research*, 34(1), 47–61. doi:10.1007/s12640-017-9853-3

Moreno-Martinez, L., de la Torre, M., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., Aguilera, J., Calvo, A. C., & Osta, R. (2020). Neuroprotective Fragment C of Tetanus Toxin Modulates IL-6 in an ALS Mouse Model. *Toxins*, 12(5), 330. <https://doi.org/10.3390/toxins12050330>

Navarrete, Francisco & Pérez-Ortiz, José & Femenía, T & García-Gutiérrez, M & García-Payá, M & Leiva-Santana, Carlos & Manzanares, J. (2008). Methods to evaluate cognitive disorders in animal models. *Revista de neurología*. 47. 137-45. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/51428231_Methods_to_evaluate_cognitive_disorders_in_animal_models

Netzahualcoyotzi, C., & Tapia, R. (2018). Tetanus toxin C-fragment protects against excitotoxic spinal motoneuron degeneration in vivo. *Scientific Reports*, 8(1). Disponible en: doi:10.1038/s41598-018-35027-w

Neumann K, et al. (2008) “Insulin Resistance and Alzheimer’s Disease: Molecular Links & Clinical Implications”. *Current Alzheimer Research*. Vol. 5 (5).

Nguyen, J. C., Killcross, A. S., & Jenkins, T. A. (2014). Obesity and cognitive decline: role of inflammation and vascular changes. *Frontiers in neuroscience*, 8, 375. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00375>

Ochoa Muñoz, L.I. (2001) Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Disponible en: <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>

Oladejo, A. O. (2011). Overview of the metabolic syndrome; an emerging pandemic of public health significance. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*, 9(2), 78–82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111026/>

Olivares Hernández JD, et al. (2015) “El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje”. *Rev Med UV*. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2015/muv151c.pdf>

Organización Mundial de la Salud (2018) Enfermedades no transmisibles. Disponible desde: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Palfreyman, M.T., Jorgensen E.M. (2010) Roles of SNARE Proteins in Synaptic Vesicle Fusion. *ResearchGate*. Disponible en: 10.1007/1-59745-481-8_3.

Parra I., Martínez I., Luna F., Alatríste V., Limón D., Mendieta L. (2020) Avances en la investigación preclínica del dominio C-Terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica en enfermedades neurodegenerativas. *Archivos de Neurociencia (Mex) INNN*. Vol. 25 (1).

Pellizzari, R & Rossetto, Ornella & Schiavo, Giampietro & Montecucco, Cesare. (1999). Tetanus and botulinum neurotoxins: Mechanism of action and therapeutic uses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/13084832_Tetanus_and_botulinum_neurotoxins_Mechanism_of_action_and_therapeutic_uses

Peters, R., Ee, N., Peters, J., Beckett, N., Booth, A., Rockwood, K., & Anstey, K. J. (2019). Common risk factors for major noncommunicable disease, a systematic overview of reviews and commentary: the implied potential for targeted risk reduction. *Therapeutic advances in chronic disease*, 10, 2040622319880392. <https://doi.org/10.1177/2040622319880392>

Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., & Montecucco, C. (2017). Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacological reviews*, 69(2), 200–235. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012658>

Popoff, M. R., & Poulain, B. (2010). Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins*, 2(4), 683–737. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/toxins2040683>

Riedel, W. J., & Blokland, A. (2015). Declarative Memory. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 215–236. Disponible en: [doi:10.1007/978-3-319-16522-6_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16522-6_7)

Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 11(8), 215–225. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>

Rodríguez-Hernández, H., Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Ramírez, G., & Reyes-Romero, M. A. (2013). Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 1–11. [doi:10.1155/2013/678159](https://doi.org/10.1155/2013/678159)

Rojas-Gutierrez E., Muñoz-Arenas G., Treviño S., Espinosa B., Chavez R., Rojas K., Flores G., Díaz A., Guevara J. (2017) Alzheimer’s disease and metabolic syndrome: A link from oxidative

stress and inflammation to neurodegeneration. *Synapse* (New York, N.Y.), Vol. 71(10), e21990. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/syn.21990>

Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current hypertension reports*, 20(2), 12. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>

Salim S. (2017). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 360(1), 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>

Secretaría de Gobernación (2018) “NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2017, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad”. *Diario Oficial de la Federación*. Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5523105&fecha=18/05/2018

Secretaría de salud (2016) “Indicadores de sobrepeso y obesidad”. Gobierno de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/articulos/indicadores-de-sobrepeso-y-obesidad?idiom=es>

Shui-Wang Y., et al. (2002) Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Long-Term Potentiation in Intact Adult Hippocampus: Requirement for ERK Activation Coupled to CREB and Upregulation of Arc Synthesis. *J. Neurosci.*, Vol. 22(5):1532–1540. Disponible en: <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/22/5/1532.full.pdf>

Sigit, F. S., Tahapary, D. L., Trompet, S., Sartono, E., Willems van Dijk, K., Rosendaal, F. R., & de Mutsert, R. (2020). The prevalence of metabolic syndrome and its association with body fat distribution in middle-aged individuals from Indonesia and the Netherlands: a cross-sectional analysis of two population-based studies. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 12(1). doi:10.1186/s13098-019-0503-1

Spencer R, Bland S. (2019) “Chapter 5 - Hippocampus and Hippocampal Neurons”. *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology Handbook of Stress Series*, Vol. 3: 57-68. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128131466000059>

Squire L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, 61(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>

Stepan, J., Dine, J., & Eder, M. (2015). Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. *Frontiers in neuroscience*, 9, 160. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00160>

Syed, M.A., Al Nuaimi, A.S., Latif Zainel, A.J.A. et al. (2020) Prevalence of metabolic syndrome in primary health settings in Qatar: a cross sectional study. *BMC Public Health* 20, 611 . Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12889-020-08609-5>

Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2019). Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. *Nutrients*, 11(11), 2579. <https://doi.org/10.3390/nu11112579>

Timper K, Brüning JC. (2017) “Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity”. *Disease Models & Mechanisms. The company of biologists.* Vol. 10, 679-689. Disponible en: doi:10.1242/dmm.026609

Toivonen, J. M., Oliván, S., & Osta, R. (2010). Tetanus Toxin C-Fragment: The Courier and the Cure? *Toxins*, 2(11), 2622–2644. doi:10.3390/toxins2112622

Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, 69(9), 421–433. Disponible en: doi:10.1002/syn.21832

Treviño, S., Vázquez-Roque, R. A., López-López, G., Perez-Cruz, C., Moran, C., Handal-Silva, A., González-Vergara, E., Flores, G., Guevara, J., & Díaz, A. (2017). Metabolic syndrome causes recognition impairments and reduced hippocampal neuronal plasticity in rats. *Journal of chemical neuroanatomy*, 82, 65–75. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.02.007>

Tune, J. D., Goodwill, A. G., Sassoon, D. J., & Mather, K. J. (2017). Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 183, 57–70. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.01.001>

Vazquez-Roque, R., Pacheco-Flores, M., Penagos-Corzo, J. C., Flores, G., Aguilera, J., Treviño S, Guevara, J., Diaz, A., & Venegas, B. (2020). The C-terminal fragment of the heavy chain of the tetanus toxin (Hc-TeTx) improves motor activity and neuronal morphology in the limbic system of aged mice. *Synapse (New York, N.Y.)*, e22193. Advance online publication. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/syn.22193>

Wible, C. (2013). Hippocampal Physiology, Structure and Function and the Neuroscience of Schizophrenia: A Unified Account of Declarative Memory Deficits, Working Memory Deficits and Schizophrenic Symptoms. *Behavioral Sciences*, 3(2), 298–315. doi:10.3390/bs3020298

Yiengprugsawan VS, Browning CJ (2019) Non-communicable Diseases and Cognitive Impairment: Pathways and Shared Behavioral Risk Factors Among Older Chinese. *Front. Public Health* 7:296. doi: 10.3389/fpubh.2019.00296

Wahl, D., Solon-Biet, S. M., Cogger, V. C., Fontana, L., Simpson, S. J., Le Couteur, D. G., & Ribeiro, R. V. (2019). Aging, lifestyle and dementia. *Neurobiology of disease*, 130, 104481. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104481>