



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ALTERACIONES DEL SÍNDROME METABÓLICO Y SU
RELACIÓN CON PROCESOS NEURODEGENERATIVOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

GABRIELA ROSAS MENDOZA



DIRECTOR DE TESIS

DR. BRYAN VÍCTOR PHILLIPS FARFÁN

Ciudad Universitaria, CD.MX.

AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARINA GAVILANES RUIZ
VOCAL: DRA. ILIANA ELVIRA GONZALEZ HERNANDEZ
SECRETARIO: Dr. BRYAN VÍCTOR PHILLIPS FARFÁN
1er. SUPLENTE: CYNTHIA SINAI NOVOA RAMIREZ
2° SUPLENTE: ALBERTO GARCIA LOZANO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE
NUTRICIÓN EXPERIMENTAL, INSTITUTO NACIONAL DE
PEDIATRÍA**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. BRYAN VÍCTOR PHILLIPS FARFÁN

SUSTENTANTE:

GABRIELA ROSAS MENDOZA

Contenido

Resumen	1
1. Introducción	3
2. Marco teórico	6
2.1 Síndrome metabólico	6
2.1.1 Definición según la OMS	7
2.1.2 Definición de la FID	8
2.1.3 Metformina	10
2.2 Criterios diagnósticos del síndrome metabólico	11
2.2.1 Resistencia a la insulina	12
2.2.2 Diabetes tipo 2	12
2.2.3 Hiperinsulinemia	14
2.2.4 Obesidad	15
2.2.5 Dislipoproteinemia	17
2.2.6 Hipertensión arterial	17
2.3 Enfermedad de Alzheimer	19
2.3.1 Formación del β-amiloide	20
2.3.1.1 Vía no amiloidogénica	21
2.3.1.2 Vía amiloidogénica	21
2.3.2 Marañas neurofibrilares: proteína tau	23
2.4 Síndrome metabólico y enfermedad de Alzheimer	23
2.5 Enfermedad de Alzheimer y estrés oxidativo	27
2.6 Estrés oxidativo	28
2.6.1 Peroxidación lipídica	30
2.6.2 Medición de la concentración de agentes oxidantes	31
2.7 Sistemas antioxidantes	32
2.7.1 Enzimas antioxidantes: catalasa	34
2.7.2 Enzimas antioxidantes: superóxido dismutasas	35
3. Planteamiento del problema	37
4. Objetivos	37

4.1	Objetivo general	37
4.2	Objetivos específicos	37
5.	Hipótesis	38
6.	Diseño experimental	39
7.	Metodología	40
7.1	Síndrome metabólico	40
7.2	Extracción y lisis de tejidos	40
7.3	Cuantificación de proteínas	41
7.4	Western blot	42
7.5	Actividad de la enzima catalasa	45
7.6	Actividad de las enzimas superóxido dismutasas	46
7.7	Cuantificación de malondialdehído	47
7.8	Análisis estadístico	49
8.	Resultados	50
8.1	Modelo del síndrome metabólico	50
8.2	Expresión de la proteína APP	50
8.3	Expresión de la proteína BACE	52
8.4	Actividad de la catalasa	53
8.5	Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	54
8.6	Medición de peroxidación lipídica (malondialdehído)	57
9.	Análisis de resultados	59
9.1	Modelo del síndrome metabólico	59
9.2	Expresión de la proteína APP	61
9.3	Expresión de la proteína BACE	62
9.4	Actividad específica de la catalasa	62
9.5	Actividad de la SOD	63
9.6	Medición de peroxidación lipídica (malondialdehído)	64
10.	Conclusión	65
11.	Bibliografía	67

Resumen

Introducción

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por anormalidades metabólicas de la secreción de insulina y producción de glucosa, entre otras. El SM está asociado a la hipertensión arterial y a la obesidad, por lo que constituye un factor de alto riesgo para la aparición de enfermedades cardiovasculares. El SM también se relaciona con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). Estas enfermedades pueden estar vinculadas por un aumento del estrés oxidativo.

Objetivo

Determinar la relación que existe entre el SM y aquellos procesos fisiopatológicos asociados a la neurodegeneración presente en la enfermedad de Alzheimer, estudiando la participación del estrés oxidativo en estas enfermedades.

Material y métodos

El modelo experimental del SM consistió de ratas macho de la cepa Wistar alimentadas con una dieta con alto contenido en carbohidratos durante 16 semanas. Un grupo de animales recibió tratamiento con metformina oral por 8 semanas. Se extrajeron el suero sanguíneo, el hipocampo y el hipotálamo para determinar la expresión de algunas proteínas involucradas en la EA. También se determinó la actividad de las enzimas anti-oxidantes catalasa y superóxido dismutasa (SOD). Finalmente, se evaluó la lipoperoxidación por medio de la concentración del malondialdehído.

Resultados

Se observó un aumento en la expresión de las proteínas involucradas en la fisiopatología de la EA en el cerebro de los animales con SM. En este

grupo de animales también aumentó la actividad de la catalasa en el suero sanguíneo, indicando un probable incremento del estrés oxidativo. Lo anterior se confirmó al encontrar una menor actividad total de la SOD en el suero sanguíneo, sugiriendo daño oxidativo a la enzima. Se observó un menor grado de lipoperoxidación en el suero sanguíneo de las ratas con SM. Esto podría deberse al aumento en actividad de la catalasa. La lipoperoxidación se incrementó en el hipotálamo de las ratas con SM y el tratamiento con metformina aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes además de reducir la lipoperoxidación en el hipotálamo. Todo lo anterior sugiere mayor estrés oxidativo debido al SM.

Conclusiones

Las evidencias obtenidas sugieren que el estrés oxidativo es responsable del aumento en el riesgo de padecer EA debido al SM. También indican que el tratamiento con metformina disminuye el estrés oxidativo y por lo tanto debería reducir el riesgo de desarrollar neurodegeneración y demencia.

1. Introducción

El estilo de vida se define como la forma en la que el ser humano vive. Se relaciona con el mantenimiento de la salud y la longevidad. La dieta juega un papel importante en el mantenimiento de una buena salud y la longevidad. Un buen estado de nutrición, el ejercicio diario y el sueño adecuado son las bases para mantener una salud óptima.

El consumo elevado de energía, la inactividad física y actividades como el tabaquismo y el alcoholismo aumentan el estrés al que se ven sometidas las células y tejidos del cuerpo. Esto puede promover enfermedades crónicas como la diabetes, el síndrome metabólico (SM), el cáncer y los trastornos neurológicos, tales como el derrame cerebral, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson y la depresión (Figura 1).

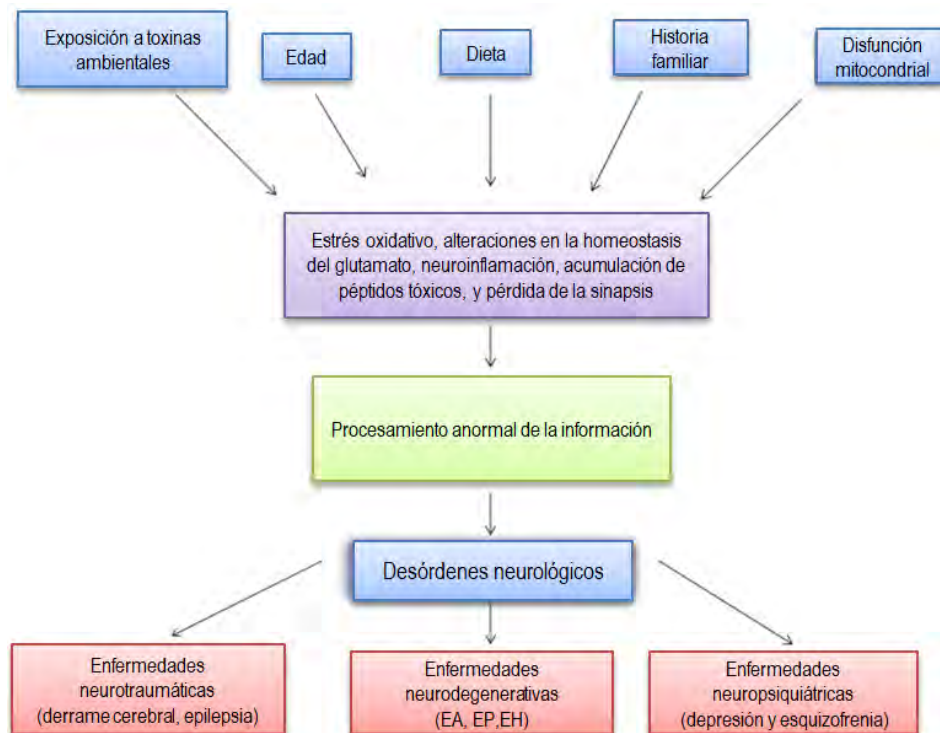


Figura 1. Factores moduladores de las enfermedades neurodegenerativas (Farooqui, 2013).

Los factores de riesgo mencionados no sólo incrementan la inflamación en el cerebro y en otros órganos, también producen disfunción del sistema inmune en todo el cuerpo [1]. Esto aumenta el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas y demencia.

La demencia se define como un deterioro adquirido de las capacidades cognitivas que entorpece la realización satisfactoria de las actividades cotidianas. En la actualidad, más de 46 millones de personas sufren demencia en todo el mundo. Según las previsiones, en el año 2050 esta cifra aumentará hasta los 131,5 millones. La demencia se caracteriza por el deterioro de la función cognitiva, afecta la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. La demencia es causada por varias enfermedades y lesiones que afectan al cerebro de forma primaria o secundaria, como la EA o los accidentes cerebrovasculares [2].

Se calcula que entre un 5% a 8% de la población general mayor a 60 años sufre demencia en un determinado momento. La demencia afecta a unos 47,5 millones de personas a nivel mundial, de las cuales un poco más de la mitad (58%) viven en países de ingresos bajos y medios (Figura 2) [3]. La EA es la forma más común de demencia, se calcula que representa entre 60% y 70% de los casos. Uno de los síntomas más tempranos de la EA es un déficit de la memoria. Por lo general, el paciente empeora con el paso del tiempo mostrando problemas perceptivos, del lenguaje y emocionales según el avance de la enfermedad. Un factor de alto riesgo para el desarrollo de la EA es padecer de SM o alguno de sus componentes [4].

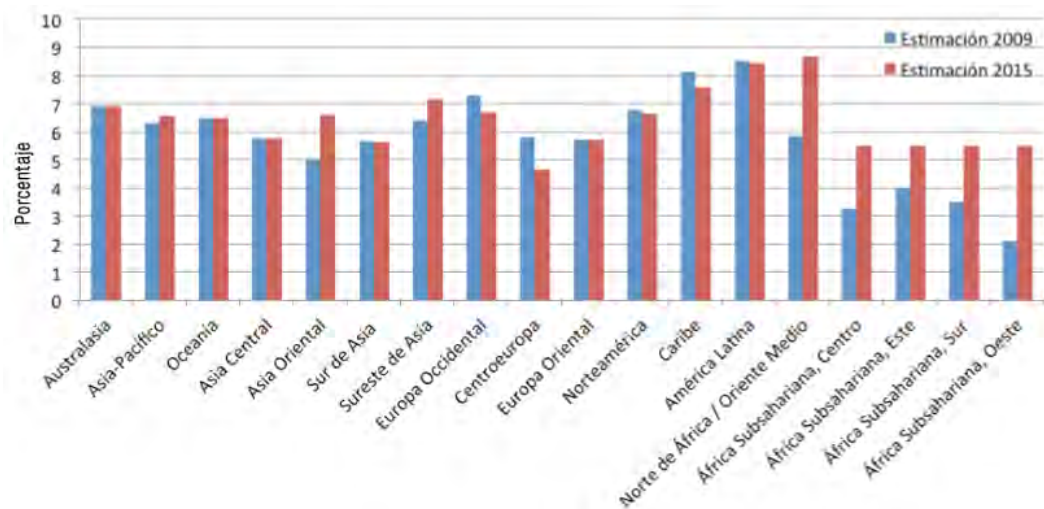


Figura 2. Prevalencia estimada de la demencia en personas mayores a 60 años, normalizada según la población de Europa Occidental (Asociación Internacional de la Enfermedad de Alzheimer, 2015).

2. Marco teórico

2.1 Síndrome metabólico

El SM se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. Su prevalencia a nivel mundial ha aumentado vertiginosamente en los últimos años, estimándose que el 25% de la población adulta mundial presenta SM. El SM es un conjunto de factores de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedades cardiovasculares. El SM se caracteriza por resistencia a la insulina e hiperinsulinemia asociada a trastornos en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, una elevada presión arterial y obesidad.

No se trata de una simple enfermedad, sino de un grupo de problemas de salud causados por una combinación de factores genéticos y factores asociados al estilo de vida, en especial el consumo elevado de energía y la ausencia de actividad física, de forma tal que el exceso de grasa corporal (en particular la grasa abdominal) y la inactividad física favorecen al desarrollo de la resistencia a la insulina [5].

Por lo tanto, el SM es un conjunto de alteraciones presentes en diferentes sistemas orgánicos, pero asociadas todas a un mismo fenómeno fisiopatológico: la resistencia a la insulina. Esta se define como una respuesta tisular inferior a la esperada, aún en presencia de concentraciones normales o supra-normales de insulina. Por supuesto, la resistencia a la insulina puede suceder en todos los tejidos blancos de la insulina; sin embargo, los actores más importantes en el síndrome metabólico son: el tejido adiposo, el músculo esquelético, el hígado, el páncreas y el cerebro [6].

2.1.1 Definición según la Organización Mundial de la Salud

En el año 1998 el grupo de trabajo sobre la diabetes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) proporcionó una definición funcional del SM. La OMS elaboró una lista de criterios de diagnóstico clínico que se modificó un año más tarde. Según estos criterios, para poder hacer el diagnóstico de SM deben existir al menos uno de los dos parámetros principales y dos de los restantes [7]. La tabla 1 muestra los criterios de diagnóstico clínico de la OMS para el SM.

Tabla 1. Criterios propuestos por la OMS para el diagnóstico del SM (Crepaldi, 2006).

Parámetro principal	Otros parámetros
Intolerancia a la glucosa Diabetes mellitus tipo 2 Glucemia en ayuno > 110 mg/dl o 2 hr post-carga \geq 140 mg/dl	<ul style="list-style-type: none"> – Hipertensión arterial \geq 140/90 mm Hg – Triglicéridos \geq 150 mg/dl – Colesterol de alta densidad: <ul style="list-style-type: none"> • hombres < 35 mg/dl, mujeres < 39 mg/dl – Obesidad, circunferencia abdominal (cresta ilíaca): <ul style="list-style-type: none"> • hombres > 102 cm, mujeres > 88 cm – Índice de masa corporal > 30 kg/m² – Microalbuminuria, excreción urinaria de albúmina \geq 20 μg/min

Aplicando la definición de la OMS, cerca del 10% de personas con tolerancia normal a la glucosa, 40% de las personas con intolerancia a la glucosa y 90% de pacientes con diabetes tipo 2 podrían tener SM. En México se realizó un estudio el cual demostró que existe una elevada

prevalencia de SM en la población (más de 6 millones de personas) de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS y más de 14 millones de mexicanos estarían afectados si se aplican otros criterios. En nuestro país, la prevalencia de síndrome metabólico en niños y adolescentes es de 20% y está fuertemente ligada al sobrepeso y a la obesidad infantil. La tabla 2 muestra la prevalencia de anormalidades en los componentes del síndrome metabólico en nuestro país [8].

Tabla 2. Anormalidades asociadas al SM en México entre 1993 a 2006. ENEC=Encuesta Nacional de Salud, ENSA=Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, ENSANUT=Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Aguilar-Salinas, 2004).

Componente	ENEC 1993 (%)	ENSA 2000 (%)	ENSANUT 2006 (%)
Sobrepeso/obesidad (IMC \geq 25 kg/m ²)	58.9	62.1	70.6
Obesidad abdominal			
Mujeres*	—	58.8	86.3
Hombres*	—	21.0	63.8
Diabetes previamente conocida	4.0	5.8	7.0
Hipertrigliceridemia	28.9	36.8	?
Hipoalfalipoproteinemia	—	40.4.8	?
Hipertensión arterial	26.6	30.7	30.8

*ENSA 2000 \geq 94 cm mujeres, \geq 102 cm hombres; ENSANUT 2006 \geq 80 cm mujeres, \geq 90 cm hombres; ENSANUT \geq 80 cm mujeres, \geq 90 cm hombres

2.1.2 Definición de la Federación Internacional de Diabetes

La nueva definición de la Federación Internacional de Diabetes (FID) tiene en cuenta la evidencia creciente de que la adiposidad abdominal aparece junto a cada uno de los componentes del SM. Bajo esta nueva

definición, una circunferencia de cintura de grandes dimensiones (que es ya una medida aceptada que nos permite conocer la adiposidad abdominal) es requisito necesario para el diagnóstico del SM (Tabla 3).

Tabla 3. Definición del SM propuesta por la FID (Zimmet, 2005)

Obesidad central	
<i>Perímetro de la cintura^a: con especificidad respecto a los distintos grupos étnicos</i>	
Más dos cualquiera de los factores siguientes:	
Aumento de los triglicéridos:	$\geq 1,7$ mmol/l (150 mg/dl) <i>o tratamiento específico de esta alteración lipídica</i>
Disminución del cHDL	$< 1,03$ mmol/l (40 mg/dl) en los varones $< 1,29$ mmol/l (50 mg/dl) en las mujeres <i>o tratamiento específico de esta alteración lipídica</i>
Aumento de la presión arterial	Sistólica: ≥ 130 mmHg o bien diastólica: ≥ 85 mmHg o bien <i>tratamiento de hipertensión diagnosticada previamente</i>
Incremento de la glucemia ^b	Glucemia en ayunas $\geq 5,6$ mmol/l (100 mg/dl) o bien <i>diabetes tipo 2 diagnosticada previamente</i> <i>Si la glucemia en ayunas es $> 5,6$ mmol/l o > 100 mg/dl, se recomienda fuertemente la realización de una PTGO, aunque no es necesaria para definir la presencia del síndrome</i>

PTGO: prueba de tolerancia a la glucosa administrada por vía oral.

^aSi el índice de masa corporal (IMC) es > 30 , se puede asumir la presencia de obesidad central y no es necesario medir el perímetro de la cintura.

^bEn la práctica clínica también es aceptable la demostración de la alteración de la tolerancia a la glucosa, pero en todos los estudios epidemiológicos relativos a la prevalencia del síndrome metabólico se deben utilizar únicamente la glucemia en ayunas y la presencia de una diabetes previamente diagnosticada para evaluar este criterio. Las cifras de prevalencia que también incorporan los resultados de la glucemia a las 2 h se pueden añadir como un hallazgo complementario

Los estudios muestran que entre los grupos de población existe variación de los niveles de obesidad, la cual aumenta el riesgo de desarrollar el SM y otras afecciones. Por lo tanto, la nueva definición de la FID incorpora umbrales de circunferencia de cintura específicos para cada etnia (Tabla 4) [9].

Tabla 4. Valores específicos del perímetro de la cintura en distintos grupos étnicos (Zimmet, 2005)

País/grupo étnico	Perímetro de la cintura (como parámetro de la obesidad central)
Europeos	Varones ≥ 94 cm Mujeres ≥ 80 cm
Asiáticos del sur	Varones ≥ 90 cm Mujeres ≥ 80 cm
Chinos	Varones ≥ 90 cm Mujeres ≥ 80 cm
Japoneses	Varones ≥ 85 cm Mujeres ≥ 90 cm

Estos valores umbral tienen una consideración de tipo pragmático, pero para establecer su relación con el riesgo se requieren datos más minuciosos. La clasificación se debe realizar según el grupo étnico, no según el país de residencia.

Aunque existen varios fármacos que se utilizan para el tratamiento del SM, el de primera elección es la metformina. Esto debido a sus múltiples beneficios y a su perfil de efectos secundarios, el cual es relativamente benigno.

2.1.3 Metformina

La metformina pertenece a la clase de fármacos conocidos como biguanidas. Estos medicamentos se utilizaban ya durante el siglo pasado como agentes terapéuticos para la diabetes mellitus. Hoy día se conocen sus importantes ventajas farmacológicas como no requerir metabolismo hepático, tener una vida media corta y eliminarse renalmente. Además de ser eficaz en el tratamiento de la diabetes, también induce pérdida de peso corporal. Diversos estudios en obesos no diabéticos han demostrado que la metformina reduce el perímetro de la cintura y mejora el perfil de lípidos con disminución de lipoproteínas de baja densidad y colesterol. Su principal efecto es disminuir los niveles de glucosa en la sangre, pero sin provocar hipoglucemia. Mejora la eficacia de la insulina endógena sin estimular su secreción. Esto conlleva a un

aumento en la síntesis de glucógeno en el tejido músculo-esquelético, sin modificar la síntesis de glucógeno hepático [10].

A pesar del tiempo que tiene este fármaco en el mercado, su mecanismo de acción no está del todo aclarado. Lo que se conoce y se ha demostrado son los siguientes aspectos:

- Aumenta la oxidación de glucosa en el tejido músculo-esquelético.
- Disminuye la hiperinsulinemia y mejora la resistencia a la insulina.
- Disminuye la oxidación de ácidos grasos y los niveles de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos.
- Favorece una reducción del peso corporal.

Esto sitúa a la metformina como un medicamento ideal y de primera línea para los pacientes, en su mayoría obesos, diagnosticados con resistencia a la insulina o síndrome metabólico. Esto se debe a su capacidad para:

- Estimular la captación de glucosa mediada por insulina.
- Reducir la producción hepática de glucosa.
- Inhibir la lipólisis y la liberación de ácidos grasos libres.
- Reducir el apetito y el peso corporal [11].

2.2 Criterios de diagnóstico del síndrome metabólico

La patogénesis del SM es compleja y deja muchas interrogantes, interviniendo factores genéticos y ambientales, los cuales influyen sobre el tejido adiposo y la inmunidad innata. El análisis de dichos factores no ha logrado demostrar que los componentes del SM se agrupen en un solo vector; de manera que el SM ya no se considera como una entidad única asociada a la resistencia a la insulina, más bien es un conglomerado de anormalidades metabólicas diferentes pero altamente relacionadas.

El SM se caracteriza por sobrepeso/obesidad, dislipoproteinemia, hiperglucemia e hipertensión arterial. El riesgo de diabetes y enfermedad cardiovascular aterosclerosa aumentan conforme se acumulan estos factores de riesgo. Aun para quien tiene solo uno de ellos, el riesgo es mayor conforme más extrema es la anormalidad. Esto creó la necesidad de establecer con cuántos de estos factores de riesgo y a partir de qué valores en cada uno de ellos podía considerarse que una persona sufre de SM [12].

2.2.1 Resistencia a la insulina

El concepto de resistencia a la insulina (RI) fue descrito por Himsworth desde hace más de 60 años. Ya desde esa época se consideró su posible participación etiopatogénica en el curso clínico de las enfermedades metabólicas. La resistencia a la insulina se define clínicamente por la incompetencia de una concentración determinada de insulina (endógena o exógena) para incrementar la utilización celular de glucosa.

En la actualidad, la resistencia a la insulina se considera como un tronco común fisiopatológico de algunas enfermedades como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y la obesidad central, además de estar presente en individuos intolerantes a la glucosa o incluso en el 25% de los sujetos delgados, aparentemente sanos con tolerancia normal a la glucosa [13].

2.2.2 Diabetes tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico complejo de patogenia multifactorial y poligénica. Se asocia frecuentemente con obesidad y otros componentes del SM. Hay un componente hereditario muy claro sobre el que probablemente influyen diversos factores ambientales, como son la alimentación, sedentarismo, tabaco, alcohol, etc.

La identificación de genes asociados con el desarrollo de la diabetes es particularmente difícil. Los defectos genéticos enmarcados en la DM2 y la resistencia a la insulina (RI) no son en un solo gen. En vez de eso, existe cierto polimorfismo y muchos genes parecen participar. Estos otros genes codifican para proteínas que están implicadas en las señales intracelulares y para enzimas claves del metabolismo intermediario (Tabla 5).

Tabla 5. Genes marcadores de DM2 y SM (González, 2005).

Metabolismo de la glucosa	Acción de la insulina	Sensibilidad/RI	Metabolismo lipídico	Obesidad
GLUT-1	Shc	PPAR- γ	LPL	Leptina
GLUT-4	IRS-1-4	PC-1	Lipasa hepática	Resistina
Hexocinasa II	Fosfatidilinositol		IFABP	Adiponectina
Fosfofructocinasa	3-cinasa (α , β)			TNF- α
Glucógeno-sintetasa				NeuropéptidoY
				Calpaina 10

RI: resistencia a la insulina.

La DM2 se caracteriza, fisiopatológicamente, por dos hechos: la resistencia a la insulina y el deterioro en la función de las células beta pancreáticas. Es probable que la RI preceda al inicio de la enfermedad en varios años, por lo que la DM2 no siempre es el inicio del SM. Aunque no todos los sujetos con RI desarrollan diabetes, se sabe que la RI es el factor predictivo más seguro para el desarrollo de la DM2 y que la mayor parte de estos pacientes y sus familiares de primer grado no diabéticos la presentan.

La resistencia a la insulina, en una primera fase, está compensada por un aumento de la secreción pancreática de insulina (hiperinsulinemia compensadora). Los niveles elevados de insulina mantienen la euglucemia por medio de la estimulación de la utilización periférica de la glucosa y la disminución en la producción de glucosa hepática. Con el

tiempo este mecanismo fracasa y aparecen de manera gradual diferentes estados de hiperglucemia a pesar de la hiperinsulinemia compensadora. La progresión desde la tolerancia normal hasta la diabetes franca es el resultado del deterioro gradual en la función de la célula beta pancreática (Figura 3). Un hecho interesante es que para el momento del diagnóstico de la DM2 se ha perdido hasta un 50% de la función de dichas células [14].

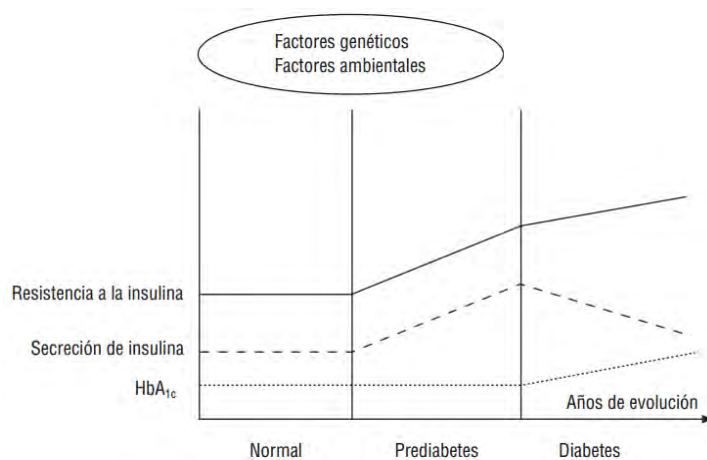


Figura 3. Mecanismo patogénico de la DM2 (González, 2005).

2.2.3 Hiperinsulinemia

La resistencia a la insulina es una condición en la cual, por diferentes factores, la insulina produce una respuesta tisular menor a la esperada y, por consiguiente, condiciona un aumento de la insulina sérica (hiperinsulinemia) para compensar la ineficiencia de la hormona. La hiperinsulinemia, por sí misma, es capaz de producir efectos sobre el equilibrio electrolítico, activar procesos de crecimiento y expresión génica que producen daño orgánico, o bien afectar procesos de coagulación y de reparación. La hiperinsulinemia relacionada al SM debe concebirse como la producción anormal y elevada de insulina ante una cantidad determinada de glucosa. La hiperinsulinemia es, de hecho, la

forma indirecta más común con la que se sospecha la existencia de resistencia a la insulina [15].

2.2.4 Obesidad

A nivel poblacional, existe una relación directa y lineal entre el índice de masa corporal y el riesgo de desarrollar hipertensión arterial, tanto en hombres como en mujeres. En la bibliografía, la obesidad se define de distintas maneras en función del índice de masa corporal (Tabla 6). Según el porcentaje de grasa corporal, se considera que un sujeto es obeso cuando ésta se sitúa por encima del 25% en varones y del 33% en mujeres. El concepto de obesidad abdominal es importante en cuanto a la relación de ésta con el riesgo de enfermedad cardiovascular y se define como diámetro de cintura > 102 cm en varones y > 88 cm en mujeres [16].

Tabla 6. Definiciones de obesidad. NHANES III=Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición III (NHANES por sus siglas en inglés), OMS=Organización Mundial de la Salud, SEEDO= Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (Alegría, 2008).

NHANES III (IMC) ^a		OMS (IMC) ^b	SEEDO 2000 (IMC) ^c
Normopeso IMC < 25		Normopeso IMC 18,5-24,9	Peso insuficiente < 18,5 Normopeso 18,5-24,9
Sobrepeso IMC 20-25		Sobrepeso IMC 25-29,9	Sobrepeso grado I 25-26,9 Sobrepeso grado II 27-29,9
Obesidad IMC > 25	Obesidad en varones IMC > 27,3	Obesidad grado I IMC 30-34,9	Obesidad tipo I 30-34,9
	Obesidad en mujeres IMC > 27,8	Obesidad grado II IMC 35-39,9	Obesidad tipo II 35-39,9
		Obesidad grado III IMC > 40	Obesidad tipo III 40-49,9 Obesidad tipo IV > 50

IMC: índice de masa corporal.

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio entre la energía consumida y la gastada. A nivel mundial ha ocurrido un aumento en la ingesta de alimentos ricos en grasa de alto contenido

energético así como un descenso en la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, los nuevos modos de transporte y la creciente urbanización. Entre 1980 y 2014, la prevalencia mundial de la obesidad se ha más que duplicado. En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos. En general en 2014, alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% de los hombres y 15% de las mujeres) eran obesos [17].

El tejido adiposo es muy activo ya que produce distintas citocinas y péptidos de regulación. La presencia de las citocinas asociadas a la obesidad informa de la presencia de un componente inflamatorio crónico subyacente a ésta. Muchos de los elementos fisiopatológicos asociados con la obesidad son factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares. La obesidad se asocia con múltiples factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión arterial, RI y DM2. El exceso de tejido adiposo no es exactamente lo que contribuye a la aparición de estos factores, sino más bien su distribución. La grasa visceral o abdominal es la que más se asocia con alteraciones importantes en el metabolismo de la glucosa e insulina y con el aumento en la prevalencia de la cardiopatía isquémica. La grasa visceral o abdominal parece ser un nexo de unión entre la obesidad y la enfermedad aterosclerótica.

La obesidad se asocia con alteraciones de la homeostasis que promueven enfermedades vasculares. El grado y duración de la obesidad, particularmente la severa, se ha asociado con alteraciones en la estructura y función cardíaca. Además, la obesidad se relaciona con todos los criterios del SM. En un reciente estudio se propone que el criterio de hiperglucemia entre los obesos es el más específico para predecir el SM, mientras que el criterio más sensible es la hipertensión arterial. Asimismo, se ha comprobado que el adelgazamiento mejora los

factores de riesgo cardiovascular; en concreto, la DM2, RI, dislipidemia, hipertensión arterial y la inflamación [18].

2.2.5 Dislipoproteinemia

La dislipoproteinemia se caracteriza fundamentalmente por aumento de los triglicéridos, disminución del colesterol de alta densidad y preponderancia de lípidos de baja densidad. Estos defectos contribuyen significativamente al aumento del riesgo de contraer enfermedad cardiovascular, sobre todo en los individuos con resistencia a la insulina.

Se considera que la dislipoproteinemia asociada con el SM es altamente aterogénica y se caracteriza por:

- Hipertrigliceridemia: triglicéridos > 150 mg/dL
- Colesterol de alta densidad disminuido: hombres < 40 mg/dL, mujeres < 50 mg/dL
- Lipoproteínas de baja densidad abundantes
- Aumento de ácidos grasos libres en plasma
- Aumento de apolipoproteína B

Las alteraciones en los triglicéridos y el colesterol se evalúan de rutina en la práctica clínica. Pero los ácidos grasos libres y la apolipoproteína B no se evalúan y no se incluyen en los criterios de las diferentes organizaciones. Sin embargo, diversos estudios demuestran su relación con el SM y las enfermedades cardiovasculares [19].

2.2.6 Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) es un factor de riesgo importante para sufrir de enfermedades cardiovasculares. Los trastornos metabólicos asociados a la HTA desempeñan un papel importante en la aparición y pronóstico a largo plazo de la HTA y además pueden modificar la estrategia terapéutica. La frecuente asociación entre HTA y diabetes

mellitus tipo 2 (DM2) ha sido ampliamente descrita, pero la interrelación de la HTA con la obesidad u otros factores de riesgo, como las alteraciones del metabolismo de la glucosa, hacen pensar que la base de esta asociación epidemiológica podría deberse a vínculos fisiológicos comunes. La resistencia a la insulina, la inflamación o la disfunción endotelial son algunos de estos posibles vínculos. El SM es una asociación de factores de riesgo cardiovascular que engloba todas estas situaciones. La HTA desempeña un papel clave en el manejo clínico de los sujetos con SM.

La obesidad y la RI, de forma conjunta e independiente (Figura 4), activan múltiples mecanismos de HTA. Uno de los resultados del Registro Nacional de Síndrome Metabólico demostró que el SM es más prevalente en pacientes con HTA que en pacientes con obesidad, pero la presencia de ambos potencia la aparición del SM [20].

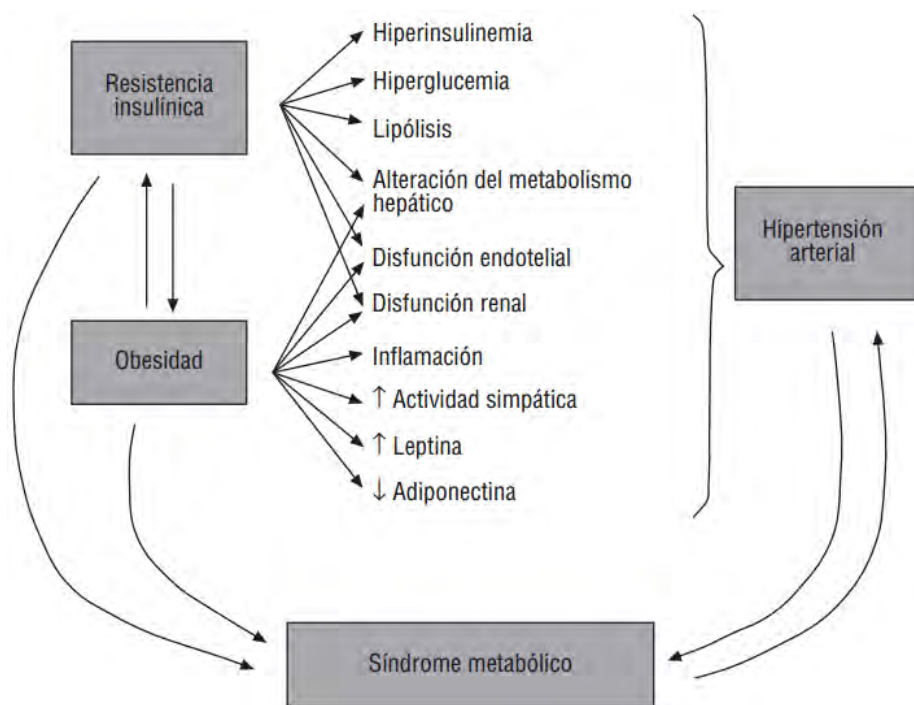


Figura 4. Fisiología de los mecanismos comunes a la hipertensión arterial y el síndrome metabólico (Cordero, 2005).

Los pacientes con SM o alguno de sus componentes tienen un mayor riesgo de padecer demencia y enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la más importante es la EA.

2.3 Enfermedad de Alzheimer

La EA es la forma más común de demencia. Se caracteriza por la pérdida progresiva de la cognición y el desarrollo de problemas de comportamiento y personalidad asociados a la muerte de células del sistema nervioso. Según el Informe Mundial sobre la EA del 2015, se estima que 46.8 millones de personas padecen esta enfermedad u otros tipos de demencia. Se proyecta que este número se duplique cada 20 años, alcanzando 131.5 millones en el 2050 [21].

La EA se caracteriza patológicamente por la pérdida de sinapsis, presencia de placas seniles extra-celulares del β -amiloide, de marañas neurofibrilares intracelulares (filamentos helicoidales pares de proteína tau hiperfosforilada) y de severa gliosis (proliferación y activación de la microglía y los astrocitos) en la corteza cerebral e hipocampo. Además se observa deposición amiloide fibrilar en los vasos sanguíneos cerebrales de pequeño y mediano tamaño. La disfunción vascular resultante se considera actualmente un elemento activo en el mecanismo de neurodegeneración y un contribuyente principal a la patogénesis de la enfermedad. También se observa estrés oxidativo aumentado, respuestas inflamatorias amplificadas y una desregulación de la homeostasis del calcio.

De acuerdo a las causas que originan la EA, esta puede clasificarse en EA de tipo familiar o de tipo esporádico. La EA de tipo esporádico representa del 90-95% de los casos; aunque su etiología se desconoce el principal factor de riesgo para sufrir EA es la edad avanzada. Otras

posibles causas implicadas en su desarrollo son: la susceptibilidad genética, desregulación del calcio y el glutamato, la inflamación crónica y la presencia de radicales libres, entre otros. La manifestación de EA familiar es muy baja y está relacionada con la presencia de mutaciones [22].

La investigación epidemiológica apoya la hipótesis de que los factores vasculares y los relacionados al estilo de vida se asocian al desarrollo de la demencia en la vida tardía. Diversos estudios han identificado múltiples factores de riesgo relacionados al estilo de vida que son potencialmente evitables. Por otro lado, los factores vasculares que se han asociado a la demencia y el deterioro cognitivo incluyen el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), los niveles elevados de colesterol y otros lípidos, la diabetes, la RI, un alto índice de masa corporal, la obesidad y la SM.

2.3.1 Formación del β -amiloide

La EA se caracteriza por la acumulación **de péptidos del β -amiloide (β A)** con diferentes tamaños en el cerebro de los afectados. El β A se origina a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (PPA) por la acción secuencial de dos enzimas: la β - y la γ -secretasa [23].

El β A es un péptido de longitud (39-43 aminoácidos) y tamaño variable (4-6 kDa), producto natural del metabolismo de la PPA. La PPA se codifica por un gen localizado en el cromosoma 21 y tiene las características estructurales de las proteínas de membrana: un largo segmento extracelular amino terminal y un corto segmento intracelular carboxilo terminal. El gen de la PPA contiene 18 exones y probablemente origina una familia de al menos 8 isoformas diferentes.

Las isoformas expresadas en las neuronas (de 695, 714, 751 y 770 aminoácidos) que contienen el exon 15 son más propensas a generar **más β A** (amiloidogénicas) que otras isoformas. La PPA se expresa en muchas células y tejidos del organismo, incluidas las neuronas, las células musculares lisas de la pared vascular y las plaquetas.

Una vez sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, la PPA atraviesa por el aparato de Golgi donde se glicosila y empaqueta en vesículas de transporte, pasa por el citoplasma y, por último, se inserta en la membrana celular. Allí se procesa mediante la acción de diversas proteasas, siguiendo dos procesos que compiten por la misma parte de la proteína [24].

2.3.1.1 La vía no amiloidogénica

En la vía más común, la proteasa α -secretasa corta la PPA justo dentro del dominio β A. Libera un fragmento extracelular soluble de 695 aminoácidos, dejando un fragmento carboxilo terminal de 83 kDa unido a la membrana. Esta parte que queda integrada en la membrana es procesada después mediante la acción de la proteasa γ -secretasa, produciendo un fragmento soluble (Figura 5) que se incorpora dentro de vesículas lisosomales para su posterior degradación. Esta cascada es conocida como la vía no amiloidogénica, porque la acción de la α -secretasa previene la formación del péptido β A con lo que se impide la formación de placas seniles.

2.3.1.2 La vía amiloidogénica

Los fragmentos liberados por la actividad de la α -secretasa no son patogénicos. Sin embargo hay otra cascada de procesamiento de la PPA menos común aunque también fisiológica, llamada vía amiloidogénica, ya que genera péptidos β A, **que a su vez forman placas seniles.**

La β -secretasa corta la PPA, generando un fragmento soluble que es secretado y un fragmento carboxilo terminal más largo que permanece anclado a la membrana. Este último es procesado **por la γ -secretasa**, liberando el péptido β A y un fragmento carboxilo terminal corto (Figura 5). El péptido β A tiene una solubilidad limitada y forma auto-agregados que constituyen las fibrillas insolubles encontradas en las placas seniles. La acción de la β -secretasa y de la γ -secretasa produce péptidos de diferentes tamaños. El péptido más común es relativamente soluble y tiene 40 aminoácidos (β A40). Otros péptidos son menos abundantes y tienen una longitud de 42 o 43 residuos (β A42-43). Sin embargo, estos últimos son mucho más insolubles y forman placas seniles rápidamente [25].

La forma oligomérica insoluble del péptido β A es tóxica para las neuronas, al tiempo que ejerce efectos tróficos sobre algunas células gliales. Numerosas evidencias sugieren que los depósitos del β A desencadenan una respuesta inflamatoria crónica.

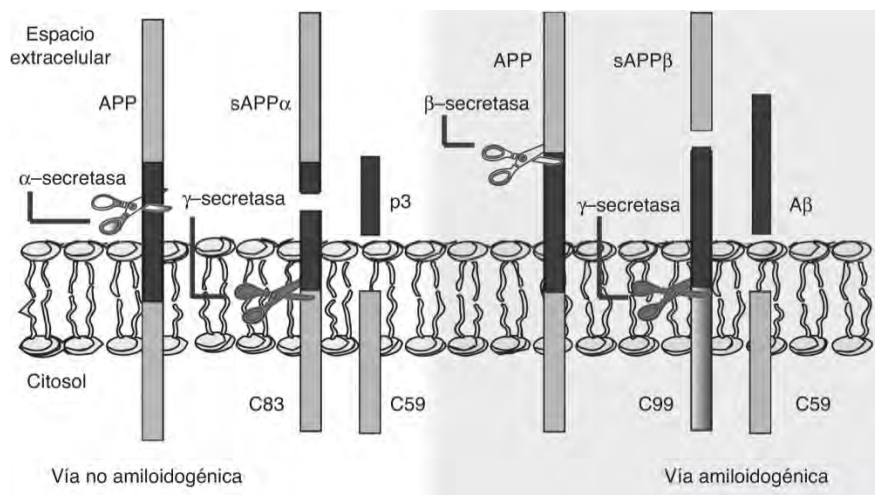


Figura 5. Esquema de los mecanismos de procesamiento de la proteína precursora del β amiloide (PPA) por medio de la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. Esta última promueve **la generación del péptido β -amiloide (β A)** y la formación de placas seniles (Rius-Pérez, 2015).

La β -secretasa, también conocida como BACE1, es una proteasa anclada a la membrana mediante un dominio transmembrana. Posee un dominio aspartil-proteasa (utiliza un aspartato para la reacción de catálisis) en su porción extracelular, que es el que realiza el corte de la PPA. Actualmente, se piensa que la actividad de BACE1 es el factor limitante para generar β A. Por lo tanto, no es de extrañar el interés suscitado por esta proteasa como diana terapéutica para tratar la EA. Varios trabajos muestran que los niveles de esta proteína y su actividad están incrementados en los cerebros afectados por la EA [26].

2.3.2 Marañas neurofibrilares: proteína tau

Las marañas neurofibrilares están formadas principalmente por filamentos helicoidales pareados de la proteína tau hiperfosforilada. En las neuronas, tau estabiliza los microtúbulos y por lo tanto es esencial para el transporte axonal. La agregación de tau reduce su habilidad para estabilizar los microtúbulos, y lleva eventualmente a la muerte neuronal. Su aparición es un evento relativamente temprano en la EA. La asociación mecanicista entre las placas seniles y marañas neurofibrilares se ha mantenido como una incógnita por muchos años, aunque existe evidencias de que el depósito de β A fibrilar induce la hiper-fosforilación de tau seguida de neurodegeneración progresiva. **Se conoce que β A es capaz de activar a** cinasas capaces de fosforilar a tau. Este resultado indica que tau tiene un papel clave en la generación de muerte neuronal **en respuesta al β A** [27].

2.4 Síndrome metabólico y enfermedad de Alzheimer

Se han identificado múltiples factores de riesgo cardiovascular se han identificado también como factores de riesgo de deterioro cognitivo, en general, y de la EA en particular. Desde el punto de vista epidemiológico, el SM aumenta el riesgo de desarrollar deterioro

cognitivo asociado a la edad. Además, varios estudios muestran que el SM está relacionado con el riesgo de desarrollar demencia. El daño cerebral aparece de inicio en el hipocampo, el cual juega un papel esencial en la formación de los recuerdos, por lo que el síntoma inicial más importante es una afectación de la memoria reciente.

Varios componentes individuales del SM se han relacionado con el riesgo de desarrollar demencia y deterioro cognitivo. La hiperglucemia, los niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad y los niveles elevados de triglicéridos son los componentes del SM que aportan mayor riesgo de desarrollar demencia. De éstos, la hipertrigliceridemia es el componente de mayor riesgo para la demencia, en particular, la demencia vascular. De hecho, los niveles elevados de ácidos grasos saturados agravan la disminución cognitiva relacionada con la edad. En general, el daño neuronal es donde convergen todos los efectos de los componentes del SM. Sin embargo, esta visión es demasiado reductiva para explicar los efectos del SM sobre el deterioro cognitivo. Un mejor enfoque es concebir a las alteraciones metabólicas como un continuo que conduce a diversos grados de disfunción cognitiva. Esto constituye la hipótesis del "síndrome metabólico-cognitivo" para explicar la compleja relación entre los trastornos metabólicos y los trastornos cognitivos, así como los límites entre el estado normal y patológico.

Los posibles mecanismos mediante los cuales el SM puede estar asociado con la EA no se conocen bien y son objeto de debate. A pesar de tener diferentes mecanismos fisiopatológicos, los diferentes componentes del SM podrían converger en una vía común que conduzca al desarrollo de los signos y síntomas clínicos de la EA. Por ejemplo, la producción de radicales libres tiene un efecto dañino directamente sobre el cerebro ya que estos causan daño neuronal. Sin embargo, los efectos de los componentes individuales del SM, especialmente la diabetes y la

hipertensión sobre el sistema nervioso central han sido mejor comprendidos.

En los pacientes diabéticos, un posible efecto directo de la RI y la hiperinsulinemia en el cerebro es un aumento de los niveles y deposición **del β A**, así como un incremento en la fosforilación de la proteína tau. Por tanto, estas anomalías metabólicas pueden estar involucradas en la formación de placas seniles, marañas neurofibrilares y muerte neuronal, todos los elementos patológicos clave de la EA [28].

Los factores genéticos, ambientales y del estilo de vida son responsables en primera instancia de la predisposición para el desarrollo de enfermedades metabólicas y trastornos neurodegenerativos. La información nutricional integrada por las áreas cerebrales, en particular el hipotálamo, contribuye a la relación entre las funciones cerebrales y el metabolismo. De hecho, un factor que contribuye a las alteraciones cerebrales del SM es una desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Esto se debe a que los niveles circulantes de glucocorticoides aumentan con el estrés. Este incremento se asocia a regulación negativa del receptor para glucocorticoides en el hipocampo de ratas con DM2. Además, los glucocorticoides provocan resistencia a la insulina en el hipocampo. Otras condiciones fisiológicas están relacionadas con desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, como el envejecimiento y los trastornos afectivos.

Aunque hay criterios divergentes para la identificación del SM, todos tienden a coincidir en que la fuerza motriz del SM es la adiposidad abdominal u obesidad central. Cuando se supera la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo, la ingesta de ácidos grasos sin aumentar su oxidación causa su deposición como triglicéridos en sitios ectópicos como el hígado, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos y vasos sanguíneos. En general, esta acumulación ectópica

de grasa participa en la disfunción metabólica. Sin embargo no todas las personas con sobrepeso u obesidad tienen disfunción metabólica porque el cuerpo humano está programado para mantener la homeostasis interna a través de mecanismos negativos de retroalimentación y regulación [29].

Una de las primeras manifestaciones de la EA es una disminución en la utilización cerebral de la glucosa. Este fenómeno es progresivo con la enfermedad y está relacionado al grado de deterioro cognitivo. Las múltiples razones del hipometabolismo de la glucosa cerebral en la EA, su relación con el estrés oxidativo y el uso de sustratos alternativos han sido estudiadas. Aunque las causas incluyen una alteración en la ingesta de alimentos, también están implicadas las hormonas como la insulina y las adipocinas. La disfunción mitocondrial e inhibición de las principales enzimas involucradas en la producción de energía como la piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasas, así como la citocromo oxidasa son características patológicas de la EA que indican una perturbación metabólica general en el cerebro.

Los datos del transcriptoma de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas incorporadas en modelos de redes metabólicas han indicado alteraciones en varios metabolitos y vías clave que están relacionados con el metabolismo de la energía, lípidos y especies reactivas de oxígeno. El papel del metabolismo de la glucosa y del lactato en la EA se ha analizado recientemente desde la perspectiva del metabolismo cerebral. Esto ha aportado pruebas sustanciales que apoyan un componente metabólico en la patogénesis de la EA. Lo anterior sugiere un estudio sistemático de los factores de riesgo metabólico de la EA esporádica [30].

2.5 Enfermedad de Alzheimer y estrés oxidativo

Una hipótesis propone que los procesos oxidativos intervienen, a nivel individual o sinérgico, en el desarrollo de la EA. La evidencia de estrés oxidativo en el cerebro de algunos enfermos procede de estudios que demuestran peroxidación lipídica, elevación de carbonilos proteicos y oxidación del material genético. El estrés oxidativo produce compuestos reactivos derivados de los lipoperóxidos, tales como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal, los cuales inducen modificaciones en las proteínas por entrecruzamiento. El estrés oxidativo interviene en la formación de las neurofibrillas, ya que se han encontrado proteínas oxidadas en estas. Las pruebas que han evidenciado el estrés oxidativo en la EA se basan en los siguientes aspectos:

- Elevada vulnerabilidad del cerebro a la oxidación debido al elevado requerimiento del oxígeno
- Evidencias *post mortem* en cerebros de pacientes con EA de una elevada concentración de los productos finales de la oxidación, elevados niveles de proteínas oxidadas, aumento en la oxidación de los lípidos membranales y cambios oxidativos en las marañas neurofibrilares.
- Procesos inflamatorios en áreas del cerebro afectadas por la EA y generación directa o indirecta de especies reactivas de oxígeno por los agregados del β A.

El **mecanismo mediante el cual el β A** causa degeneración neuronal permanece poco claro y una teoría que emerge cada vez con más fuerza **es que el β A** se produce en microambientes con altos niveles de estrés oxidativo. Primero **se demostró que el propio péptido β A** era tóxico para células nerviosas en cultivo. En dicha toxicidad esta implicada la producción de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo. Luego se encontró que **el β A genera** especies reactivas de oxígeno en medios acuosos mediante un mecanismo dependiente del oxígeno pero

independiente de la presencia de metales. El β A es un iniciador muy poderoso de la peroxidación lipídica y el peróxido de hidrógeno media la **toxicidad del β A**.

También se ha observado que las enzimas antioxidantes y los reactivos que inhiben las enzimas oxidantes bloquean la producción de peróxido de hidrógeno **y la toxicidad del β A**. Los productos finales de la glicosilación avanzada son una familia de moléculas complejas que surgen por la modificación post traduccional de las proteínas. Se forman mediante la reacción de Maillard entre azúcares reductores y los grupos amino de las proteínas. Aunque estas moléculas se han estudiado principalmente por su implicación en la diabetes, está cada vez más claro que la glicosilación de las proteínas ocurre en individuos no diabéticos. Además el estrés oxidativo incrementa la frecuencia de auto-oxidación de los lípidos insaturados de la membrana inducida por el radical hidroxilo. La fragmentación de los lípidos hidroperóxidos resultantes, mediada por metales reducidos, libera aldehídos reactivos que pueden modificar a las proteínas. Estas modificaciones ejercen un mayor efecto sobre proteínas ricas en lisina con neutralización de su carga. En consecuencia suceden alteraciones en las interacciones electrostáticas entre proteínas, ocasionalmente con entrecruzamientos intra- e inter-moleculares. La formación de productos finales de la glicosilación avanzada, aldehídos reactivos y radicales libres pueden individualmente conllevar a modificaciones patológicas en las proteínas neuronales, juntos pueden actuar de manera sinérgica y acelerar la alteración de las proteínas [31].

2.6 Estrés oxidativo

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos aerobios. Esto se debe a que desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones en la respiración

celular. Pero el oxígeno también constituye un punto de partida para el estrés oxidativo que causa daño celular. El estrés oxidativo se refiere a una elevada producción de radicales libres que rebasa la capacidad de las defensas antioxidantes.

Los radicales libres son especies químicas (moléculas o átomos) con electrones desapareados en su orbital más externo. La mayoría de las sustancias del organismo tienen sólo electrones apareados y por lo tanto son químicamente estables. Los radicales libres pueden tener tanto carga positiva como negativa, o ser neutros. El número total de electrones en los radicales libres es impar, esto les hace muy inestables y reactivos ya que tienden a eliminar los electrones solitarios para lograr y mantener su estabilidad. El radio de acción de los radicales libres en general es muy reducido, acostumbran reaccionar con las moléculas que tienen a su alrededor.

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2-5% escapa a esta reducción bivalente y se reduce de manera monovalente. De esto resulta la formación de especies reactivas del oxígeno, que son átomos o moléculas con un número impar de electrones en su órbita más externa, lo cual los hace muy reactivos.

La toxicidad del oxígeno se explica debido a la formación de las especies reactivas del oxígeno. En general, estas especies son radicales libres que participan en la iniciación o propagación de una reacción en cadena. Las especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel fisiológico pero también dan lugar a reacciones de oxidación indeseadas contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes.

El estrés oxidativo causa una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que a su vez provocan deterioro y muerte celular. Las especies reactivas del oxígeno que se producen en cualquier estado fisiológico producen continuamente daño a otras moléculas, como las proteínas y lípidos. Así, se pueden detectar en individuos sanos aminoácidos modificados en las proteínas y peroxidación de los lípidos. El estrés oxidativo puede provenir de:

- Deficiencias en el sistema de defensa antioxidante.
- Aumento de la formación de especies reactivas del oxígeno, cuya alta reactividad puede provocar peroxidación lipídica, daño de la membrana celular y degradación proteica entre otras cosas [32]

2.6.1 Peroxidación lipídica

El estrés oxidativo se produce cuando el exceso de radicales libres altera el balance entre las reacciones de reducción y de oxidación en la célula. Entre todas las clases de biomoléculas que pueden ser atacadas por los radicales libres, los lípidos son los más susceptibles. Las membranas celulares son ricas fuentes de ácidos grasos poli-insaturados, que son fácilmente oxidados por los radicales libres. Esta oxidación, conocida como peroxidación lipídica, genera como productos hidroperóxidos y aldehídos reactivos como el malondialdehído (MDA) [33]. La peroxidación lipídica se inicia por cualquier especie con suficiente reactividad para sustraer un átomo de hidrógeno de las cadenas de ácidos grasos de las membranas celulares. El principal efecto de la peroxidación lipídica es disminución en la fluidez de la membrana, alterando sus propiedades y conduciendo a la ruptura de las proteínas transmembranales.

La peroxidación es un proceso auto-catalítico que consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La peroxidación lipídica es iniciada principalmente por radicales hidroxilo, generados mediante reacciones catalizadas por metales de transición. En la etapa de iniciación, los radicales libres captan un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de los ácidos grasos. Dejan un electrón no apareado en el carbono convirtiéndolo en un radical lipídico e iniciando la etapa de propagación. El radical generado sufre un reajuste molecular para formar un dieno conjugado que es capaz de combinarse con el oxígeno para formar un radical peroxilo. Este puede sustraer un nuevo átomo de hidrógeno y empezar una reacción en cadena. La etapa de terminación se refiere a la finalización de la reacción en cadena por agotamiento del sustrato o por la acción de las defensas antioxidantes. El resultado final de la peroxidación lipídica es la formación de productos terminales de oxidación con toxicidad diversa como MDA, hidroxinonenal y hexanal [34].

2.6.2 Medición de la concentración de agentes oxidantes

Durante los últimos años se ha tratado de medir la concentración de agentes oxidantes en el organismo, pero ha resultado difícil porque tienen tiempos de vida media muy cortos en general. La espectrometría de resonancia por rotación (espín) de electrones es la única técnica analítica que mide directamente las especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, se han desarrollado métodos para medir algunas especies reactivas de oxígeno, de manera indirecta, mediante los productos terminales de su acción oxidante sobre proteínas, lípidos y el material genético. Un ejemplo es la peroxidación lipídica. En este proceso los

ácidos grasos no saturados, particularmente los fosfolípidos de las membranas celulares, son atacados por radicales. El resultado es la formación de hidroperóxidos difíciles de medir, ya que se degradan rápidamente. No obstante, la lipoperoxidación constituye el patrón de oro cuando se trata de probar la función de los radicales en algún tipo de daño celular y existen varias formas de medirla. Una de estas formas es la medición del MDA que es producido por la hidrólisis de los hidroperóxidos. El MDA es una especie química muy difusible con capacidad de reaccionar con biomoléculas importantes como proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos generando efectos mutagénicos y carcinogénicos. El MDA reacciona fácilmente con el ácido tiobarbitúrico (TBA), formándose una solución coloreada que puede ser medida espectrofotométricamente (Figura 6). Este análisis es muy práctico y sencillo pero le falta sensibilidad, por lo que es recomendable aumentarla utilizando procedimientos fluorométricos o cromatográficos [35].

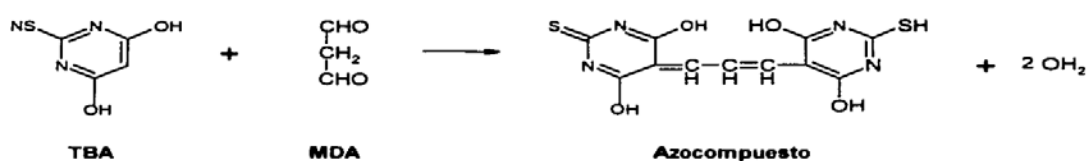


Figura 6. Determinación del malondialdehído por medio de la reacción con ácido tiobarbitúrico (Pérez, 2000).

2.7 Sistemas antioxidantes

Cuando se produce un desequilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es el estrés oxidativo. Este puede afectar a diversas moléculas, pudiendo verse alteradas las funciones fisiológicas. Así, el daño causado por los radicales libres es un

factor protagonista de numerosas enfermedades como la inflamación crónica, patologías cardiovasculares, neoplasias, padecimientos neurodegenerativos, esclerosis múltiple, epilepsia y SM. El cerebro es muy vulnerable, ya que tiene bajos niveles de defensas antioxidantes y alto contenido en lípidos, en especial de ácidos grasos insaturados muy susceptibles al ataque de los radicales libres.

Los radicales libres provocan reacciones en cadena que solo pueden ser detenidas por la acción de moléculas antioxidantes. Estas moléculas constituyen los sistemas defensivos de las células, ya que se oponen al efecto de los radicales libres. Los sistemas antioxidantes intervienen en distintas fases de las reacciones productoras de radicales libres desviándolos hacia productos inertes.

Un grupo de sistemas antioxidantes defensivos trabaja sobre la cadena del radical inhibiendo los mecanismos de activación. Otro grupo neutraliza la acción de los radicales libres ya formados y por tanto detiene la cadena de propagación. En este grupo pueden encontrarse enzimas destoxicadoras notables como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Las enzimas en su mayoría utilizan elementos trazas como co-factores para sus reacciones.

El sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos de los radicales libres. Los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios y terciarios según su función. En los primarios se encuentran las enzimas que protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres, entre las que se encuentran:

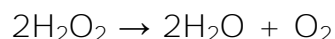
- La citocromo oxidasa que está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno.
- La superóxido dismutasa que está especializada en captar el radical anión superóxido y convertirlo en peróxido de hidrógeno.

- La catalasa, la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa que neutralizan al peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua.

Las defensas antioxidantes protegen al organismo contra el daño oxidativo, pero no tienen el 100% de eficiencia. Los antioxidantes no enzimáticos son frecuentemente añadidos a los alimentos para prevenir la peroxidación lipídica que se asocia a numerosas patologías y a estados de estrés oxidativo [36].

2.7.1 Enzimas antioxidantes: catalasa

La catalasa es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano. Su actividad varía en dependencia del tejido; ésta resulta más elevada en el hígado y riñones, más baja en el tejido conectivo y epitelios o prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en mitocondrias y peroxisomas [37]. La catalasa es una ferrihemoenzima cuya función principal es transformar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular según la reacción:



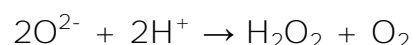
La enzima es un tetrámero compuesto por unidades idénticas. Cada monómero contiene un grupo prostético hemo en el centro catalítico. La conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular requiere la presencia de NADPH para la activación de los tetrámeros. La principal fuente del NADPH es la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la primera reacción de la vía de las pentosas.

La actividad de la catalasa en homogeneizados de tejidos animales tiene probablemente su origen en la ruptura de los peroxisomas durante la homogeneización. Para estudiar su acción se debe ser muy cuidadoso,

ya que la pérdida de actividad enzimática sucede fácilmente. Esto es debido a la disociación de la catalasa en subunidades cuando es expuesta a ácidos, álcalis o cuando es congelada. Su actividad ha sido estudiada en modelos animales de enfermedades metabólicas. Por ejemplo, se ha visto una disminución en la actividad de la catalasa y de la superóxido dismutasa en la DM2 misma que puede ser prevenida por la administración de insulina [38].

2.7.2 Enzimas antioxidantes: superóxido dismutasas

Las superóxido dismutasas (SOD) son metaloenzimas abundantes en las células aeróbicas y son de las enzimas antioxidantes más importantes. Su acción consiste en la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, que es menos reactivo, mediante la siguiente reacción:



Las SOD pueden dividirse en 2 familias filogenéticas diferentes: cobre-zinc superóxido dismutasas (Cu/ZnSOD) y hierro-manganeso superóxido dismutasas (Fe/MnSOD) [39]. En las células eucariotas se expresan tres tipos diferentes de SOD, que en su conjunto contribuyen a regular los niveles del anión superóxido.

a) La SOD1 fue la primera enzima SOD que se caracterizó. Es un homodímero con cobre y zinc que se encuentra casi exclusivamente en el espacio citoplasmático. La SOD1 es una de las proteínas más estables que se conocen, resiste repetidos ciclos de congelación-descongelación y refrigeración prolongada. Se puede inactivar por el producto de la reacción de dismutación (H_2O_2). Además se inhibe por cianuro (CN^-) y dietilditiocarbamato, lo que ha permitido establecer métodos específicos para la determinación de su actividad enzimática.

b) La SOD2 o Fe/MnSOD es un tetrámero que contiene manganeso en su centro activo y se puede encontrar en las bacterias, plantas y animales. La SOD2 se encuentra dentro de la mitocondria, que es el organelo más sometido al estrés oxidativo.

c) La SOD3 fue la enzima que se caracterizó más recientemente. Se trata de un tetrámero que contiene cobre y zinc. La SOD3 está confinada exclusivamente al espacio extracelular [40].

3. Planteamiento del problema

El síndrome metabólico (SM) consiste en una serie de factores de riesgo que han sido ligados al deterioro cognoscitivo y la enfermedad de Alzheimer (EA). Algunos estudios han encontrado asociaciones significativas entre la hipertensión, la DM2 y el SM con el desarrollo de la demencia. Debido a que actualmente no existe algún tratamiento específico que pueda curar la demencia, el estudio de sus factores de riesgo así como la instauración de medidas preventivas son de particular interés. Por lo tanto, es importante promover la investigación en este campo debido a la prevalencia e impacto del SM y la EA sobre el estado funcional y de salud de los pacientes. Con esto se busca reforzar y promover el desarrollo de estrategias para la prevención así como para el tratamiento de la constelación de alteraciones metabólicas asociadas al SM.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la relación que existe entre el síndrome metabólico y los procesos fisiopatológicos que conducen a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer por medio del estudio del papel del estrés oxidativo en modelos animales con SM.

4.2 Objetivos específicos

- Inducir el síndrome metabólico en un modelo animal.
- Determinar los niveles de expresión de la proteína precursora de amiloide que participa en la enfermedad de Alzheimer en el hipocampo e hipotálamo.
- Determinar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y de la catalasa en el hipocampo y el hipotálamo.

- Determinar los niveles de peroxidación lipídica en el hipocampo e hipotálamo.
- Determinar el efecto del tratamiento con la metformina sobre el síndrome metabólico y los demás parámetros que se evaluarán.

5. Hipótesis

El cerebro de ratas con síndrome metabólico presenta estrés oxidativo y esto promueve cambios en las proteínas que participan en la enfermedad de Alzheimer como la proteína precursora de amiloide (APP). De cumplirse lo anterior, se puede indicar que el SM podría estar estrechamente relacionado con la EA.

6. Diseño experimental

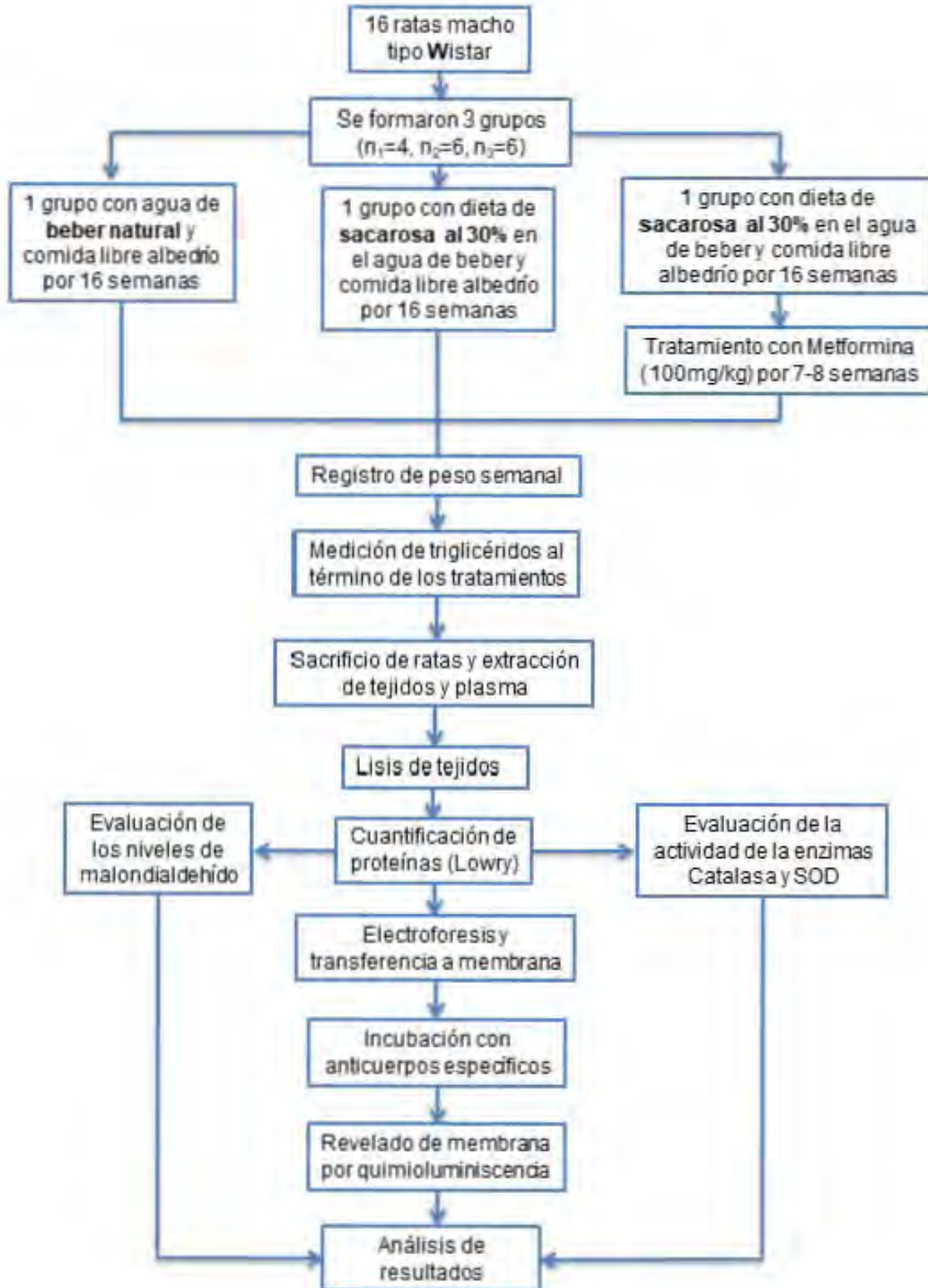


Figura 7. Diagrama de flujo del diseño experimental.

7. Metodología

7.1 Síndrome metabólico

Se usaron 14 ratas macho Wistar de 3 meses de edad aproximadamente, con un peso corporal entre 180-200 g. Se dividieron en 3 grupos, el grupo control recibió comida y agua de beber natural al libre albedrío, mientras que los otros dos 2 grupos tuvieron comida y agua de beber con 30% de sacarosa al libre albedrío para inducir el síndrome metabólico. Uno de estos grupos, al término de la dieta, se trató con metformina, la cual se administró en una dosis de 100 mg/kg de peso corporal una vez al día por vía esofágica durante 7-8 semanas. Todos los grupos se pesaron semanalmente. Al término de las 16 semanas con la dieta y con el tratamiento con metformina, se midieron los triglicéridos y la glucosa en sangre después de 6 h de ayuno. Para esto se usaron dos aparatos: el Accutrend GCT de Roche para la medición de los triglicéridos y el FreeStyle Abbot para la medición de la glucosa, ambos con tiras reactivas.

7.2 Extracción y lisis de tejidos

Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis (dependiendo del peso de cada uno de las ratas fue el tamaño de la dosis) de pentobarbital, y decapitadas para extraer la sangre y el cerebro. Se disecaron el hipocampo e hipotálamo, que fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70° C para su posterior análisis. La sangre que se obtuvo, fue centrifugada inmediatamente a 12000 rpm durante 15 min a 4° C para aislar el suero sanguíneo. Los sueros fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70° C hasta su análisis.

La lisis de tejidos se realizó usando un homogeneizador (Polytron, Pro Scientific Inc.), agregando 0.75 mL de buffer de lisis por tejido. El buffer de lisis estaba compuesto por HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM,

KCl 50 mM, glicerol 3-fosfato 5 mM, tritón X-100 al 0.10%, NaF 50 mM y NaPPI 5 mM. Todo esto se mezcló y se congeló hasta su uso; antes de usarlo se agregó DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM, ortovanadato activado 1 mM y anti-proteasas (Complete Mini, Roche). Posteriormente al agregar el buffer se homogenizaron los tejidos, proceso por el cual las células fueron lisadas en fragmentos pequeños que dieron lugar a una suspensión uniforme y estable. Posteriormente los homogeneizados se centrifugaron a 12000 rpm por 30 min a 4° C, obteniendo de esta manera las proteínas totales.

7.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó con el método de Lowry, un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. En este método existen dos pasos que llevan el desarrollo de color, la reacción con cobre en álcali y la reducción del reactivo fosfomolibdotúngstico por el complejo proteína-cobre. A la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas. El método consta de dos etapas: 1) reacción de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} en presencia de tartrato para evitar la precipitación. Se forma un complejo de coordinación entre el Cu^{2+} y nitrógeno peptídico. Estos complejos causan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que participarán en la segunda etapa de la reacción. 2) Reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico), reducido por medio de los fenoles de la proteína a un complejo de color azul oscuro que se mide colorimétricamente. El complejo coloreado presenta dos máximos de absorción en las longitudes de onda 560 y 680 nm [41].

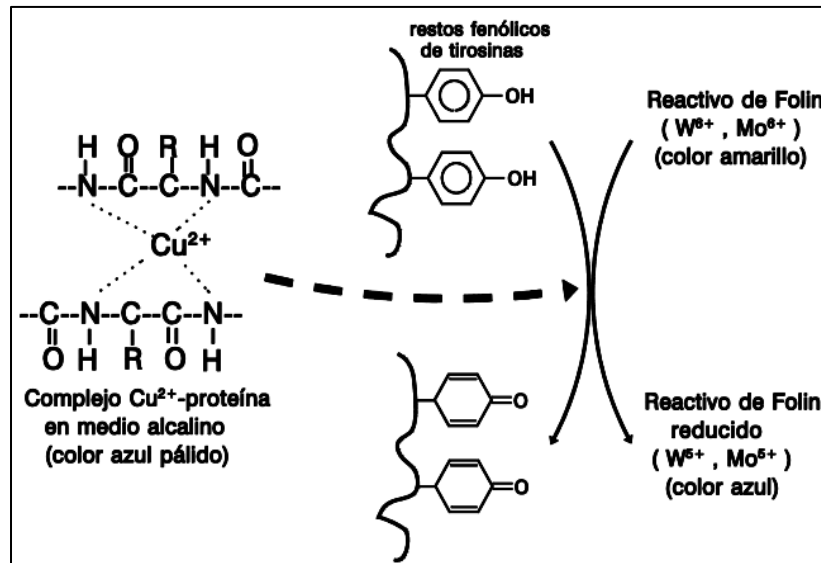


Figura 8. Esquema de las reacciones que se llevan a cabo en el método de Lowry [41].

Dado que este método da resultados variables se requiere una curva de calibración. Esta se hizo con una solución patrón de albúmina sérica bovina de 1 mg/mL. Posterior a la cuantificación de las proteínas se prepararon las muestras para usar 50 µg de proteína en la realización de la técnica de Western Blot.

7.4 Western blot

La técnica de Western blot es un sistema rápido y muy sensible para la detección y caracterización de proteínas. Se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación de proteínas por electroforesis y transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana de las proteínas de una mezcla compleja (lisado total celular). Los antígenos que se han transferido a la membrana son reconocidos por anticuerpos monoclonales o poli-clonales específicos que los reconocen [42].

Después de la preparación de muestras se realizó la electroforesis. Se preparó un buffer de carga con Tris-HCl 60 mM, glicerol 20%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1% y β -mercaptoetanol 10% con la finalidad de que las estructuras tridimensionales de las proteínas se rompan y permitan que las proteínas se separen en función del peso molecular mediante la electroforesis. Este tipo de electroforesis se caracteriza por la utilización de dos tipos de geles: un gel de separación, en el que el porcentaje de acrilamida se elige en función de las proteínas que se desea separar y un tampón compuesto por Tris-HCl con pH 8.8; en este caso se preparó el gel al 10% para separar proteínas de 15-100 kDa. En el gel de concentración en el que se polimerizan los pocillos, el porcentaje de la acrilamida es considerablemente inferior (alrededor del 4%) y el tampón se compone por Tris-HCl pero ajustado a un valor menor de pH (6.8).

El gel de poli-acrilamida se coloca en un compartimento que contiene un tampón de migración a un pH de 8.3, compuesto por Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1%. La electroforesis realizó a 0.4 mA por 150-180 min hasta que el colorante desapareció del gel. Durante la electroforesis se cargó junto con las muestras un marcador de peso molecular (Prestained Protein Marker, Cell Signaling) para identificar a las proteínas de interés mediante su peso molecular.

Después de la electroforesis es necesario marcar la proteína de interés para poder visualizarla. El gel no es una superficie adecuada para poder marcar las proteínas, por lo que es necesario transferir las proteínas a un soporte más adecuado. Las proteínas se transfieren a membranas de poli-fluoruro de vinilideno, previamente activadas con metanol, ya que tienen una gran capacidad de unión a las proteínas y gran resistencia mecánica. La transferencia se llevó a cabo en una cámara semi-seca por 60 min a 0.3 A, la membrana y gel fueron sumergidos en un buffer de

transferencia compuesto por Tris 48 mM, SDS 0.037%, glicina 39 mM y metanol 10% para poder hacer la transferencia.

Al terminar la transferencia, la membrana se bloquea. La membrana posee una gran afinidad por las proteínas, por lo tanto se bloquea para prevenir la unión no específica del sistema de detección a la membrana. El paso de bloqueo evita que los anticuerpos y otras proteínas involucradas en el sistema de detección se peguen inespecíficamente a la membrana, reduciendo el riesgo asociado de tener un elevado número de falsos positivos. En este caso las membranas se incubaron con leche descremada al 5% por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la incubación con anticuerpos específicos.

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-PPA hecho en ratón, anti-BACE1 hecho en conejo (ambos de Abcam, diluidos 1:1000) y anti-Actina hecho en conejo 1:10000 (Sigma). Las membranas se dejaron incubando en los anticuerpos primarios durante 24 horas a 4° C. Posteriormente se lavaron las membranas para luego incubarlas con el anticuerpo secundario correspondiente.

Para finalizar, la membrana se revela mediante una reacción de quimioluminiscencia. La reacción quimioluminiscente ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. El sustrato quimioluminiscente que se utilizó fue el luminol (Millipore). La reacción de oxidación de este sustrato es catalizada por la peroxidasa de rábano en presencia de peróxido de hidrógeno. Tras su oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado, luego pasa a su situación basal reducida que es más estable y emite luz en el proceso. Si esta reacción se produce sobre una membrana y ésta se pone en contacto con una película auto-radiográfica, la película queda impresionada. El sistema tiene la ventaja de ser reversible por lo que permite eliminar los anticuerpos secundarios y volver a analizar la membrana con otros

anticuerpos [44]. Los resultados fueron documentados en el equipo ChemiDoc y analizados mediante el software Quantity One (ambos de Biorad).

7.5 Actividad de la enzima catalasa

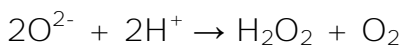
Para determinar la actividad de la enzima catalasa se utilizó un kit de detección fluorométrico. Este ensayo fluorescente es muy sensible para detectar la actividad de la catalasa. Mide la cantidad del sustrato (peróxido de hidrógeno) restante después de añadir la muestra. Este kit provee un ensayo homogéneo simple de alto rendimiento adaptable a la cinética.

Para la utilización del kit se preparó en el momento, según el número de muestras, una solución de reacción, peróxido de hidrógeno (40 μM) y un coctel con dimetilsulfóxido, 40 unidades/mL de una solución de peróxido de rábano y solución de reacción. Se preparó también una curva estándar para medir específicamente la actividad y concentración de la catalasa. Se diluyeron los sueros 1:200 y se tomaron 100 μL de proteína total de los tejidos para determinar la actividad de la catalasa.

Para determinar la actividad de la catalasa se usaron 50 μL de las muestras y 50 μL de una solución de peróxido de hidrógeno (40 μM) en una placa de 96 pozos y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. Después se agregaron 100 μL del coctel de reacción y se incubó la placa por 15 min a temperatura ambiente. La medición de la actividad de la catalasa se realizó al llevarse a cabo la reacción de peróxido de hidrógeno con la catalasa. El peróxido de hidrógeno sobrante reacciona con el dimetilsulfóxido y peroxidasa para generar un reactivo que se puede leer por fluorescencia a 570 nm.

7.6 Actividad de las enzimas superóxido dismutasas

Para determinar las SOD se utilizó un kit de detección colorimétrico para medir la actividad de las isoenzimas SOD1 (Cu/ZnSOD citosólica), SOD2 (Fe/MnSOD mitocondrial) y SOD3 (Cu/ZnSOD extracelular) en extractos de células y tejidos de mamíferos. Las SOD representan la defensa celular principal contra la toxicidad del anión superóxido catalizando su conversión a oxígeno y peróxido de hidrógeno, mediante la siguiente reacción:



Los aniones superóxido tienen una vida media muy corta y, en consecuencia, deben ser producidos continuamente.

En este ensayo colorimétrico, los iones superóxido son generados mediante la conversión de xantina y oxígeno a ácido úrico y peróxido de hidrógeno, reacción que es catalizada por la xantina oxidasa. El superóxido entonces convierte el reactivo WST-1 en WST-1/formazan, un producto colorido que absorbe a 450 nm. La SOD reduce la concentración del ion superóxido y disminuye la velocidad de formación de WST-1/formazan. La reducción de WST-1 es una medida de la actividad de la SOD presente en la muestra experimental. En otras palabras, la actividad relativa de SOD de la muestra experimental se determina a partir del porcentaje de inhibición de la velocidad de formación del WST-1/ formazan.

Para el ensayo se preparó un buffer SOD para luego preparar la solución de xantina y las diluciones de SOD. Se preparó una solución de xantina usando una fórmula para calcular el volumen requerido dependiendo de la cantidad de muestras a cuantificar. Mediante el uso de otra fórmula se calculó la cantidad necesaria para preparar la Master Mix combinando los siguientes reactivos: buffer SOD, reactivo WST-1, xantina oxidasa y

agua destilada. Se preparó también una curva estándar de SOD con diferentes diluciones. Las muestras de suero y de las proteínas de los diferentes tejidos se prepararon realizando diluciones 1:100 de cada muestra. Para medir la actividad de la SOD citosólica a las diluciones de las muestras de los diferentes tejidos se les agregó azida de sodio para inhibir la actividad de la SOD mitocondrial.

Para determinar la actividad de la SOD se utilizaron 25 μL de las diluciones de cada muestra por triplicado y 25 μL del buffer SOD. Para la curva estándar se utilizaron 25 μL de las diferentes diluciones de cada muestra. Después se usaron 150 μL del Master Mix en cada pozo y para empezar la reacción se agregó a cada pozo 25 μL de solución de xantina. De inmediato se tomaron lecturas de la placa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm cada min durante 10 min a temperatura ambiente. Para el cálculo de los resultados se tomaron las pendientes de cada curva y se realizó el análisis estadístico.

7.7 Cuantificación de malondialdehído

Como consecuencia del metabolismo celular normal se producen radicales libres que interaccionan con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Dada la naturaleza inestable de los productos resulta difícil determinar la magnitud de la peroxidación lipídica. Sin embargo, es más fácil determinar los productos de su degradación metabólica, constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta capacidad reactiva de los cuales el más significativo es el MDA.

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados, el más utilizado se basa en la reacción del MDA con el TBA. Este forma productos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables y que se pueden

cuantificar por espectrofotometría de absorción visible o por fluorometría.

Para la cuantificación del MDA se usaron 200 μ L de plasma y 100 μ L de proteína de las muestras de cada tejido. Se prepararon los siguientes reactivos: buffer de KH_2PO_4 150 mM pH 7.4, solución de ácido acético al 20% pH 2.5, buffer de KCl al 5% y reactivo antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT) al 4% en metanol. También se preparó una solución patrón de MDA disolviendo el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) y el reactivo cromógeno de ácido tiobarbitúrico (TBA) en BHT + metanol (reactivo antioxidante). Además se preparó una solución de ácido en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1.6% que se disuelve al momento en buffer de fosfatos calentando ligeramente para disolverlo.

Para empezar la cuantificación se usó 1 mL de buffer de fosfatos y se agregó la cantidad de suero o de proteína correspondientes. En seguida se añadieron 50 μ L del antioxidante BHT+metanol y se agitó durante 30 segundos. La curva de calibración se hizo utilizando TEP como estándar, a diferentes concentraciones con el tratamiento anteriormente mencionado. Después de la agitación se incubaron las muestras a 37° C con agitación constante durante 30 min, agitando vigorosamente por 30 segundos cada 15 minutos. Luego se agregó 1 mL de ácido acético al 20% y 1.5 mL de TBA y se incubaron las muestras a 100° C por una hora, agitando vigorosamente a los 30 min por 1 min. Para detener la reacción, las muestras se colocaron en hielo. Se adicionó 1 mL de KCl al 2% y 5 mL de n-butanol, los tubos se agitaron vigorosamente durante 90 s y se continuó con una centrifugación a 1500 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. En este momento se pudo apreciar la separación de dos fases, la fase orgánica y la fase acuosa. Se tomaron 100 μ L de la fase orgánica y se colocaron en una placa de 96 pozos, la cual se leyó

por fluorescencia a una longitud de onda de 553 nm en la emisión, usando una longitud de onda de 513 nm para la excitación.

7.8 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas t de Student para determinar la significancia estadística entre las diferentes condiciones. Los valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos. Los datos se muestran como la media (promedio) \pm el error estándar de la media.

8. Resultados

8.1 Modelo del síndrome metabólico

En la tabla 7 se observa que el grupo con SM mostró significativamente mayor cantidad de grasa abdominal, que se midió pesando esta, y niveles de triglicéridos que el grupo control. Por lo tanto de acuerdo a la definición del SM, se puede hacer un diagnóstico de SM temprano. El tratamiento con la metformina mostró una tendencia a reducir los niveles de triglicéridos a valores cerca de la normalidad.

Parámetro	Control (n=4)	SM (n=6)	SM + metformina (n=6)
Pesos iniciales (g)	182 ± 2.18	182 ± 0.894	188 ± 2.87
Pesos finales (g)	436 ± 13.7	459 ± 16.6	465 ± 10.0
Grasa abdominal (g)	11.5 ± 2.55	19.0 ± 1.25**	20.1 ± 1.09*
Triglicéridos (mg/dL)	186 ± 30.2	345 ± 35.4**	272 ± 36.8
Glucosa (mg/dL)	82.7 ± 3.34	104 ± 16.6	82.8 ± 3.88

Tabla 7. Características de las ratas control, con síndrome metabólico o tratadas con metformina. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ con respecto del grupo control.

8.2 Expresión de la proteína APP

Mediante la técnica de Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal contra el receptor de la proteína APP, se encontró una mayor expresión de la APP en el en el grupo con SM comparado al

grupo control en el hipocampo. No hubo diferencias significativas en el hipotálamo, indicando que aquí no se modificó la expresión de la APP. El tratamiento con metformina recuperó la expresión de APP en el hipocampo, ya que la disminuyó con respecto del grupo con SM.

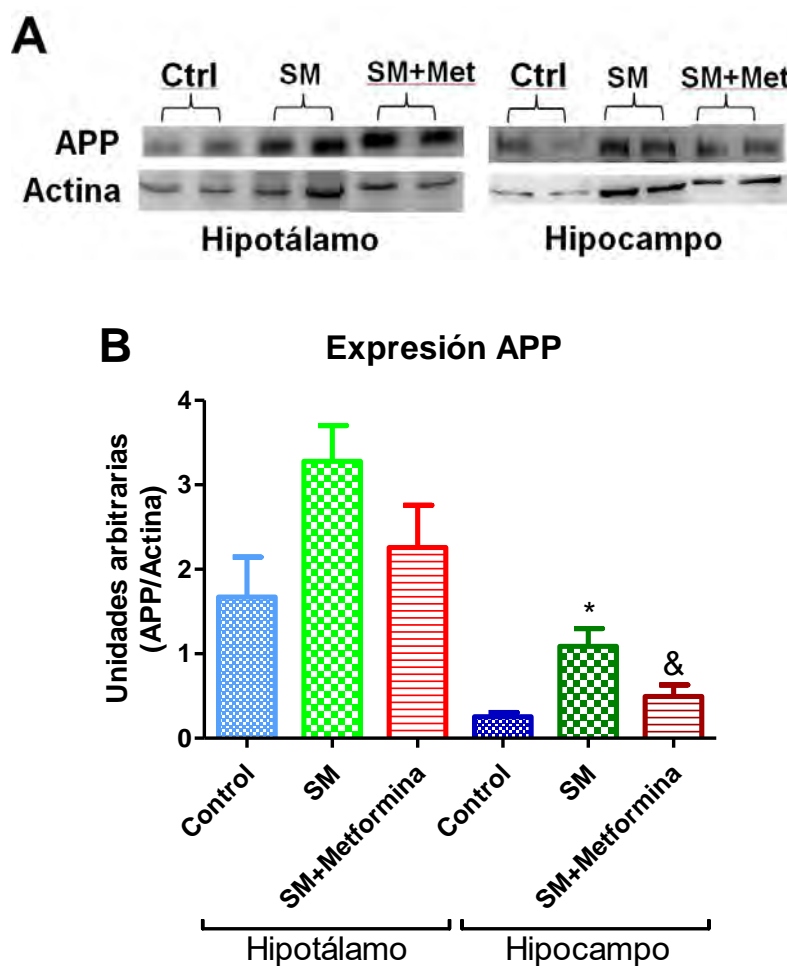


Figura 9. A) Imágenes representativas del Western blot para la proteína APP usando como control de carga la proteína actina en el hipotálamo e hipocampo. B). Expresión de la APP en el hipotálamo y el hipocampo. Pruebas de análisis de varianza para las diferencias entre los grupos: * $p \leq 0.05$ respecto del grupo control, & $p \leq 0.05$ respecto del grupo con SM (n=6)

8.3 Expresión de la proteína BACE

Hubo más expresión de BACE1 en el grupo con SM en comparación con el grupo control en el hipocampo. Aunque en el hipotálamo se observó una tendencia similar, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. El tratamiento con metformina recuperó la expresión de BACE1 en el hipocampo ya que redujo su expresión con respecto del grupo con SM.

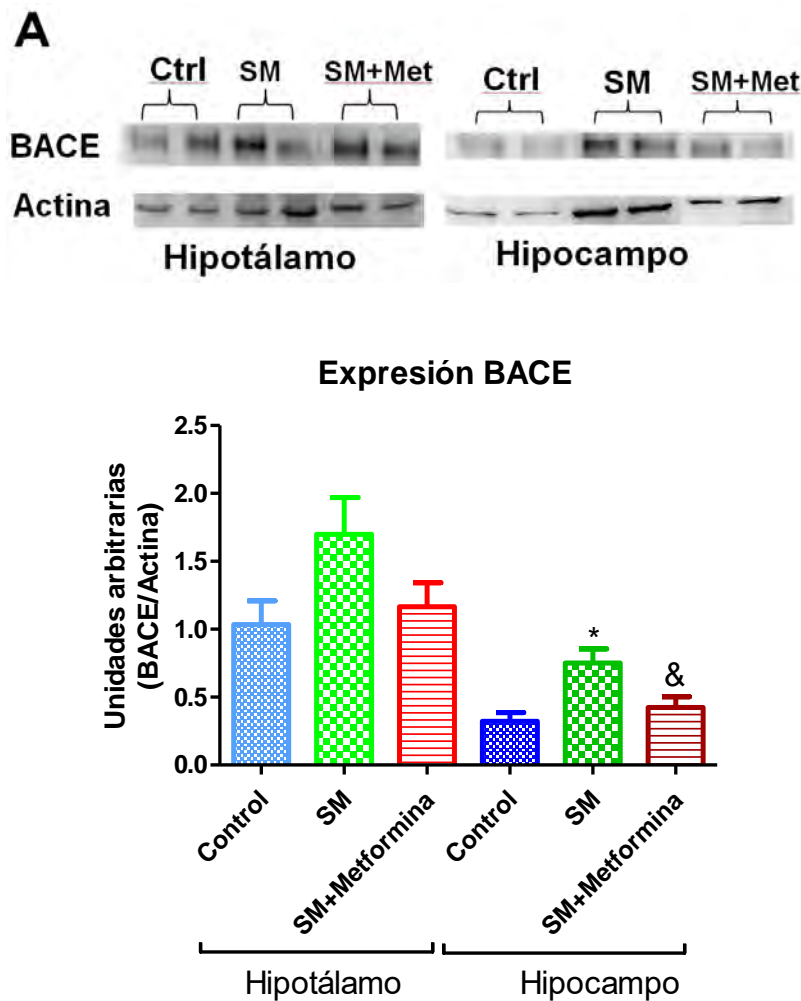
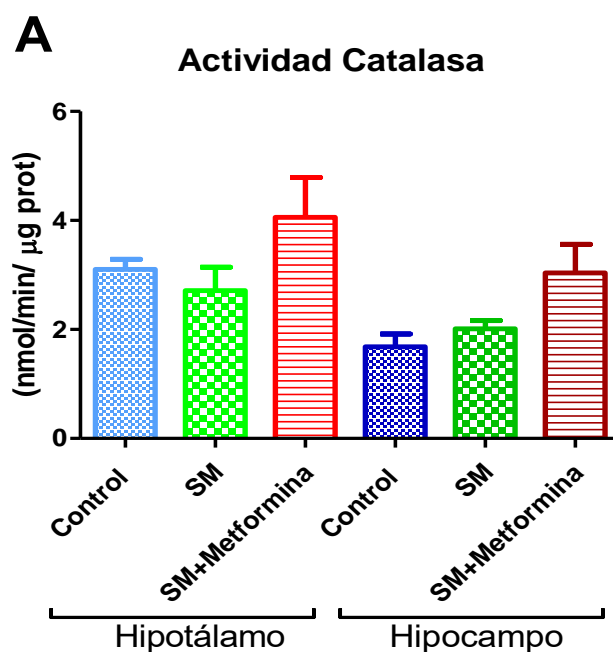


Figura 10. A) Imágenes representativas del Western blot para BACE1 en el hipotálamo e hipocampo. B) Expresión de BACE1 en el hipotálamo e hipocampo. Pruebas de análisis de varianza para las diferencias entre

los grupos: * $p \leq 0.05$ respecto del control, & $p \leq 0.05$ respecto del grupo con SM (n=6).

8.4 Actividad de la catalasa

La catalasa es una de las enzimas antioxidantes más importantes. Se midió su actividad específica en tejidos y suero. No hubo diferencias significativas entre los grupos en el hipotálamo ni en el hipocampo. En el suero, se observó mayor actividad de la catalasa en el grupo con SM en comparación con el grupo control. El tratamiento con la metformina recuperó la actividad de la catalasa ya que la redujo respecto del grupo con SM.



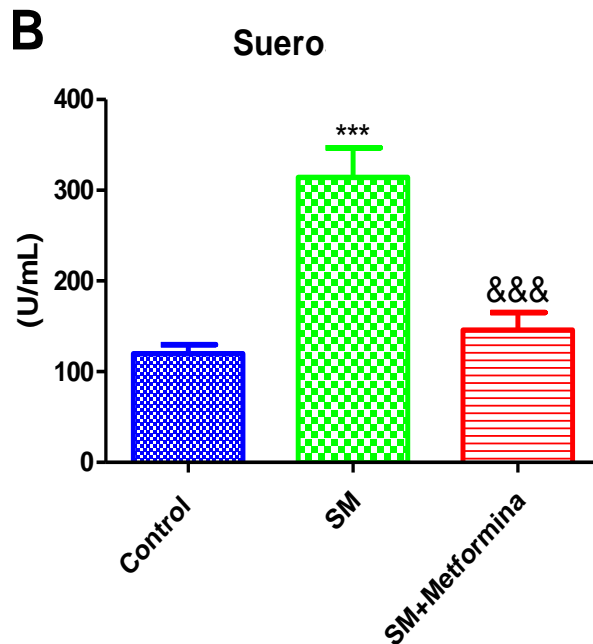


Figura 11. A) Actividad de la catalasa en el hipotálamo e hipocampo. B) Actividad de la catalasa en el suero. Pruebas de análisis de varianza para las diferencias entre los grupos: *** $p \leq 0.001$ respecto al control, &&& $p \leq 0.001$ respecto al grupo con SM.

8.5 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

No hubo diferencias significativas en la actividad total de la SOD entre el grupo control y grupo con SM en el hipotálamo e hipocampo. Sin embargo, la actividad total de la SOD se incrementó debido al tratamiento con la metformina en comparación al grupo con SM y con el grupo control. En el suero, la actividad total de la SOD se redujo en el grupo SM comparado con el grupo control y la metformina recuperó su actividad ya que la aumentó en comparación con el grupo con SM y con el grupo control.

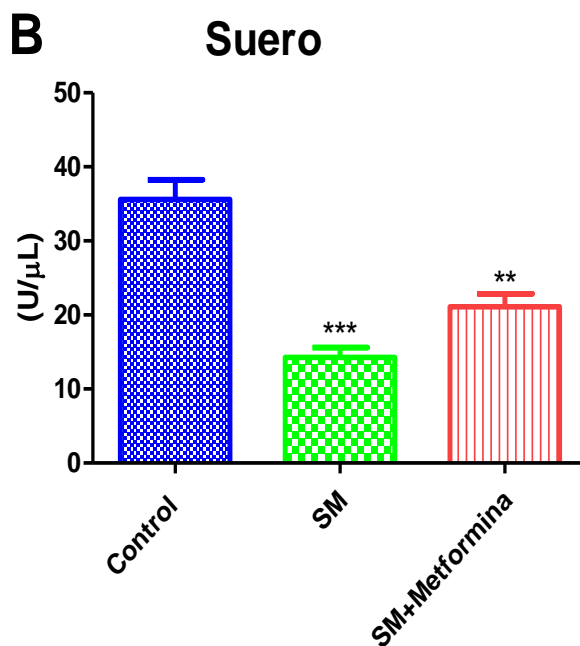
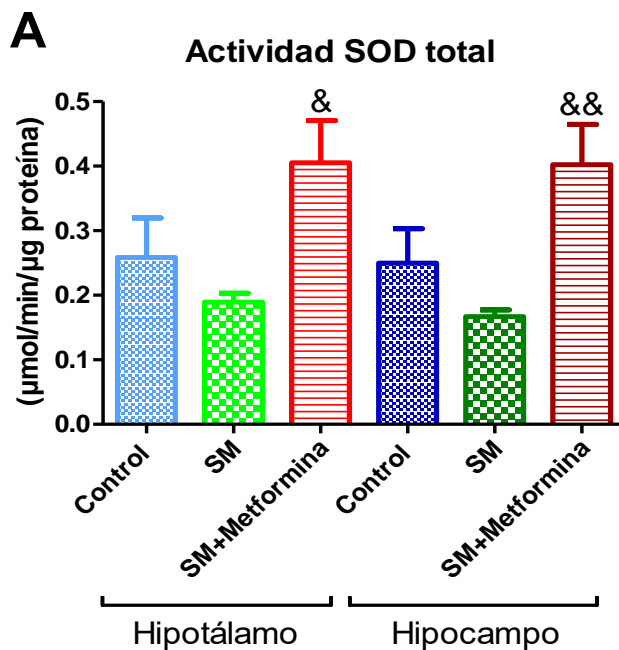
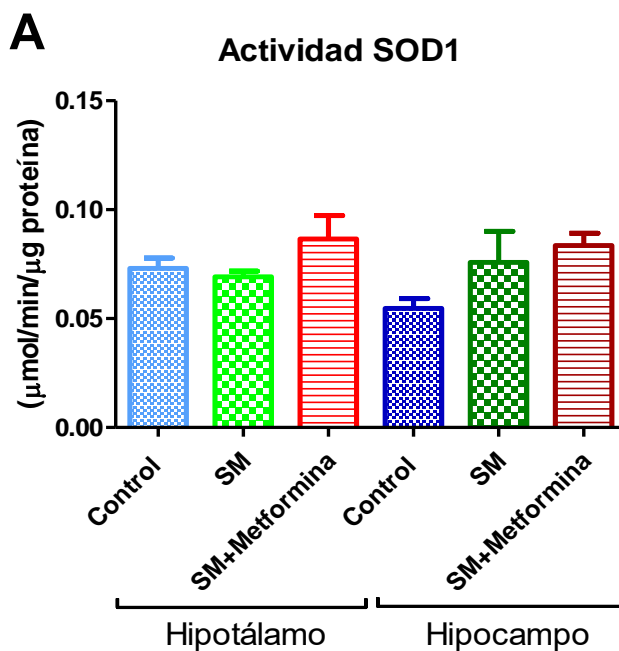


Figura 12. A) Actividad total de la SOD en el hipotálamo e hipocampo. Pruebas de análisis de varianza para las diferencias entre los grupos: & $p \leq 0.05$, && $p \leq 0.01$ respecto del grupo con SM. B) Actividad total de la SOD en suero. Pruebas de análisis de varianza: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ con respecto del grupo control.

La actividad de la SOD2 (Fe/MnSOD) se detectó eficientemente, pero la de la SOD1 (Cu/ZnSOD) no se detectó óptimamente. Así mismo, no existieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con SM para la SOD2 en el hipotálamo e hipocampo. Pero el tratamiento con la metformina recupero la actividad de la SOD2 en ambos tejidos, ya que la aumentó con respecto al grupo con SM.



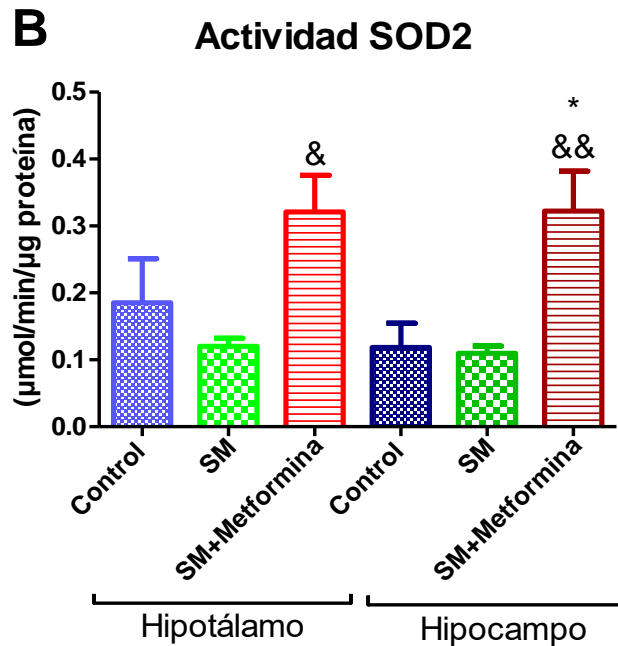


Figura 13. A) Actividad de la SOD1 en hipotálamo e hipocampo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. B) Actividad de la SOD2 en hipotálamo e hipocampo. Pruebas de análisis de variancia: &p≤0.05, &&p≤0.01 respecto del grupo con SM, *p≤0.05 respecto del grupo control.

8.6 Medición de peroxidación lipídica (malondialdehído)

El MDA es un producto final de la peroxidación lipídica y uno de los marcadores de daño oxidativo más fiables y ampliamente utilizados. El grupo con SM mostro una tendencia a mayores niveles del MDA comparado al grupo control en el hipotálamo sin ser significativo y el tratamiento con metformina redujo los niveles de MDA comparado con el grupo con SM. En el hipocampo no se observaron diferencias significativas entre los grupos. En el suero, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

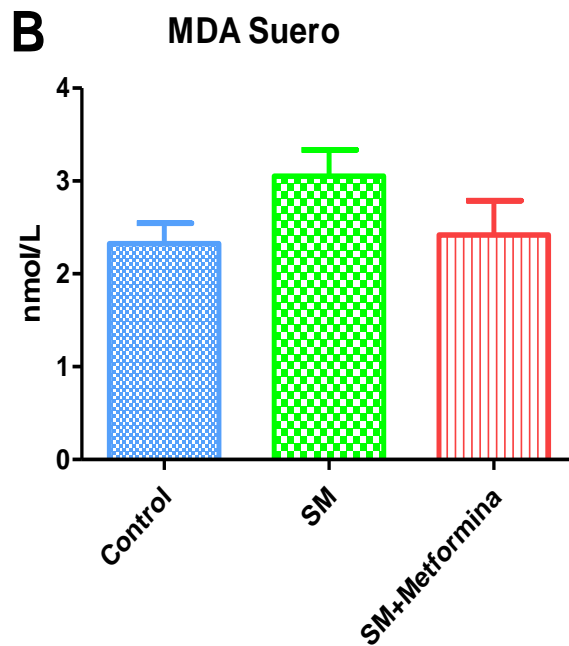
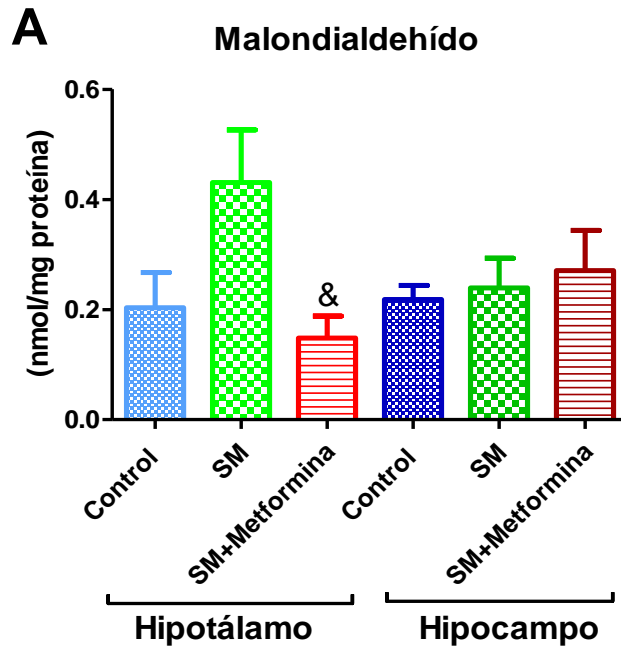


Figura 14. A) Concentración de MDA en el hipotálamo e hipocampo. Pruebas de análisis de varianza: &math;p \leq 0.05 respecto del grupo con SM. B) Concentración de MDA en el suero. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

9. Análisis de resultados

9.1 Modelo del síndrome metabólico

Para el estudio del SM se han desarrollado diversos modelos animales, sobre todo en roedores, para poder determinar sus efectos directamente sobre el organismo. Entre los modelos desarrollados, los que aportan mayor información al entendimiento de la obesidad y el SM en el humano, son aquellos que se hacen a través de la administración de dietas hiperenergéticas.

El SM es un trastorno complejo que incluye obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión arterial, RI e hiperglucemia, así como altos niveles de triglicéridos y colesterol de baja densidad. Para poder determinar la presencia del SM se deben presentar al menos tres factores de los ya mencionados en la tabla 1. El modelo que se utilizó fue un tratamiento con sacarosa al 30% en el agua de beber por 16 semanas. Tanto la grasa abdominal como el nivel de triglicéridos en el grupo experimental fueron más altos en comparación con el grupo control. Existe una relación controlada entre la insulina y el metabolismo de la glucosa, que da lugar a cambios relativamente pequeños en los niveles de glucosa en plasma. Sin embargo en el SM esta relación es interrumpida por la resistencia a la insulina, lo que a su vez ocasiona que, los triglicéridos del plasma no se degraden ni se almacenen en el tejido adiposo, si no que siguen circulando y causando un nivel alto de triglicéridos en el grupo con SM. El incremento en la adiposidad corporal afecta negativamente la acción de la insulina debido a la producción de hormonas inductoras de RI. Así mismo, deteriora la función de las células beta pancreáticas por la elevación de ácidos grasos libres y la consecuente inducción de lipotoxicidad.

Algunos estudios en humanos han encontrado que el deterioro cognitivo se mejora cuando se trata la DM2 con la metformina. Este es el medicamento más utilizado para el tratamiento de la DM2 y también induce una pérdida de peso corporal. Diversos estudios en obesos no diabéticos han mostrado que la metformina mejora el perfil de lípidos. La administración de la metformina en una concentración de 100 mg/kg de peso corporal mostró un efecto benéfico sobre el nivel de triglicéridos. Mostró una tendencia a disminuir los triglicéridos a niveles normales, aunque no hubo diferencia significativa con respecto al control. Se ha mostrado que el déficit cognitivo está asociado a la DM2. Se observó en las ratas que se trataron con metformina, ya que hubo una disminución del nivel de triglicéridos. El principal efecto de la metformina es disminuir los niveles de glucosa en la sangre sin estimular la secreción de insulina, es decir, mejora la eficacia de la insulina endógena, beneficio que se observa al disminuir el nivel de glucosa en sangre de las ratas con SM.

Aunque la metformina es el fármaco de primera elección para la DM2, su mecanismo de acción aún se desconoce. Lo que está cada vez más claro es que para su acción se necesita de la activación de la proteína cinasa dependiente del adenosín monofosfato (AMPK, por sus siglas en inglés). Se ha propuesto que la relación entre la AMPK y la metformina radica en la capacidad de este fármaco para inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta inhibición provoca una reducción en la síntesis del adenosín trifosfato, que probablemente es la señal para que la AMPK se active. Es posible que la AMPK disminuya los niveles de glucosa y triglicéridos en sangre, ya que estimula los procesos que generan energía e inhibe aquellos que consumen energía [44,45].

9.2 Expresión de la proteína APP

Se investigó la expresión de la proteína precursora del β amiloide (APP) ya que esta es un indicador de la producción del β -amiloide, el cual está involucrado en la neurodegeneración asociada a la EA. La RI puede contribuir a la fisiopatología de la EA a través de diversos mecanismos, uno de los cuales consiste en que puede interferir con el procesamiento normal de la APP aumentando los niveles de β A.

Las ratas con SM mostraron una tendencia de mayor expresión de APP en el hipotálamo, sugiriendo que hay **más β A** y por tanto más daño en esta área cerebral. Las neuronas que expresan el receptor de la insulina en la rata están localizadas en áreas hipotalámicas que modulan la homeostasis de la glucosa, la ingesta de alimentos y el gasto energético. Por lo tanto, se podría esperar que estas funciones se vieran afectadas en las ratas con SM. Al administrar metformina hubo una ligera disminución en la expresión de APP en el hipotálamo sin existir una diferencia significativa.

En el hipocampo de las ratas con SM hubo mayor expresión de APP. Debido a que el hipocampo participa en la memoria, en la EA hay una disfunción de la memoria como consecuencia de la atrofia de este tejido. Esta atrofia podría deberse al aumento en la expresión de APP y el daño resultante **asociado al β A** y puede relacionarse además con el metabolismo reducido de la glucosa. Al administrar la metformina se redujo la expresión de APP debido a que la metformina mejora la eficacia de la insulina endógena, la cual disminuye los niveles solubles de APP.

Es probable que la insulina active varios mecanismos, algunos de los cuales afectan la cognición y otros relacionados con parámetros metabólicos además del procesamiento de APP [46]. En cuanto a la APP,

la insulina puede inhibir la degradación del fragmento de dominio intracelular de la APP, el cual se produce **por corte de la γ -secretasa**; de ese modo interfiere con la función de señalización de este fragmento. **Sin embargo, aún se desconoce el impacto que esto tiene sobre el β A y la EA.**

9.3 Expresión de la proteína BACE

Como ya se había mencionado, una de las características de la EA es la presencia de placas seniles cerebrales, que consisten en la acumulación **del péptido β -amiloide**. La actividad de BACE1 puede correlacionarse con la deposición de β A en el cerebro, ya que en el SM la actividad de BACE1 aumenta. Esto sugiere que una elevación en la actividad de BACE1 es significativa en la producción patológica del β A. En este estudio se demostró que el SM está asociado al estrés oxidativo. El aumento de la expresión de BACE1 se correlacionó con el estrés oxidativo y el envejecimiento, que son factores clave en el inicio de la EA. Aunque el mecanismo molecular que regula la actividad de BACE1 en respuesta al estrés oxidativo no se conoce bien, la activación de BACE1 parece estar regulada a nivel de proteínas [47].

9.4 Actividad específica de la catalasa

En los últimos años se han estudiado las asociaciones existentes entre algunas severas enfermedades neurológicas severas y el estrés oxidativo. Estas asociaciones se han establecido a través de los marcadores periféricos de daño por estrés oxidativo. Existen múltiples factores que hacen al cerebro muy vulnerable al daño oxidativo en comparación con otros tejidos del organismo. Por una parte, tiene una muy baja actividad de las enzimas antioxidantes. Por otro lado, el cerebro está altamente oxigenado, además de que tiene elevados

niveles de hierro y otros sustratos fácilmente oxidables como ácidos grasos poli-insaturados.

Como se sabe, una dieta con alto consumo de alimentos de elevado contenido energético promueve aumento de peso corporal y obesidad. También resulta en resistencia a la insulina, aumento de la inflamación y estrés oxidativo en los tejidos cerebrales y viscerales. En este estudio, el alto consumo de sacarosa resultó en SM. Sin embargo el SM no modificó de manera significativa la actividad de la catalasa en el hipotálamo e hipocampo, aunque en este último se observó una tendencia a mayor actividad al administrar metformina. Existen numerosos estudios que confirman que la metformina disminuye el daño oxidativo. En línea con este efecto, en células endoteliales la metformina reduce los niveles de las especies reactivas del oxígeno.

En el caso del suero, la actividad de la catalasa fue mayor en los animales con SM respecto a las ratas control. Debido a que es probable que el daño oxidativo aumente en el grupo con SM, el aumento en la actividad de la catalasa puede representar un mecanismo compensatorio para combatirlo [48]. Así, la reducción en la actividad de la catalasa por el tratamiento con metformina sugiere que el fármaco disminuyó el daño oxidativo.

9.5 Actividad de la SOD

La superóxido dismutasa es la primera línea de defensa de las células frente al estrés oxidativo. La actividad de dos tipos de SOD fue investigada: La SOD1 que se encuentra en el citoplasma y cuya parte activa contiene cobre y zinc, y la SOD2 que se encuentra en la mitocondria y cuya parte activa tiene hierro y manganeso (SOD2).

La SOD1 es bastante abundante y comprende cerca del 1% de las proteínas totales en el cerebro. Se expresa en varios tipos celulares y en

cantidades casi siempre altas. Como se había mencionado, el SM se ha relacionado con una modificación en la actividad de las principales enzimas antioxidantes. Algunas investigaciones han propuesto que en el inicio del desarrollo del SM hay un aumento de la actividad de la SOD para combatir el aumento en la formación de radicales libres. Sin embargo, hay datos publicados recientemente que han comprobado que una vez establecido el SM se produce una disminución en la actividad y expresión de ambas isoformas de la SOD [49]. Los datos mostraron una reducción leve en la actividad total tanto de la SOD y como de la SOD2, sin alcanzar la significancia en el hipotálamo e hipocampo. En el suero, la disminución en la actividad total de la SOD si alcanzó la significancia y el tratamiento con metformina restauró la actividad normal. El tratamiento con metformina aumentó significativamente la actividad de la SOD2 en el hipotálamo e hipocampo. Esto sugiere que aunque el SM es incipiente, ya se encuentra establecido lo suficiente como para afectar la actividad de la SOD, la cual mejora con la metformina aumentando así la protección contra el estrés oxidativo.

9.6 Medición de peroxidación lipídica (malondialdehído)

El estrés oxidativo da lugar a compuestos reactivos derivados de los lipoperóxidos, tales como el MDA que induce modificaciones en las proteínas por entrecruzamiento. Los niveles de MDA están directamente asociados al daño por radicales libres en la célula, específicamente por el radical hidroxilo. En este estudio hubo una tendencia al aumento en la concentración del MDA en el hipotálamo por el SM. El tratamiento con metformina tendió a disminuir los niveles de MDA en el hipotálamo. Los datos se podrían explicar si hay más susceptibilidad a la lipoperoxidación en el hipotálamo que en el hipocampo o en el suero.

Varias alteraciones del metabolismo oxidativo han sido referidas en la EA. Así se señalan cambios en la peroxidación lipídica con afectación de las membranas celulares. También se han encontrado déficits en la respiración mitocondrial y especialmente en la actividad del complejo IV (citocromo oxidasa) en la corteza cerebral de los pacientes con EA.

10. Conclusión

El modelo del SM se logró inducir por una dieta alta en carbohidratos, por eso es de vital importancia mejorar los hábitos alimenticios ya que la nutrición juega un papel importante en la prevención de la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

Las ratas con SM mostraron un aumento en la expresión de la APP en el hipocampo. Así mismo, los animales con SM mostraron un aumento en la expresión de la BACE1 en el hipocampo.

El tratamiento con metformina redujo la expresión de APP en el hipocampo y expresión de BACE1 en el hipotálamo e hipocampo.

El grupo con SM mostró un incremento en la actividad de la catalasa y una disminución en la actividad total de la SOD y menor lipoperoxidación en el suero sanguíneo. El tratamiento con la metformina disminuyó la actividad de la catalasa y aumento la actividad total de SOD en el suero sanguíneo.

La actividad total de la SOD mostró una tendencia a disminuir debido al SM en el hipotálamo y el hipocampo, al igual que la actividad de la SOD2. El tratamiento con la metformina aumento la actividad total de la SOD y SOD2 en el hipotálamo e hipocampo y disminuyó la lipoperoxidación en el hipotálamo.

Las ratas con SM presentaron estrés oxidativo y a esto se asoció un incremento en la producción de amiloide β .

Perspectivas

Se requiere de estudios adicionales, por ejemplo, ensayos clínicos a largo plazo para determinar si la metformina es efectiva para disminuir la incidencia y prevalencia de neurodegeneración y demencia.

11. Bibliografía

1. Farooqui, A. (2013). *Metabolic syndrome an Important Risk Factor for Stroke, Alzheimer Disease and Depression*. New York, NY: Springer.
2. *Demencia*. (2016). Organización Mundial de la Salud. Retrieved 18 May 2016, from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
3. Romano, M., Nissen, M., Del Huerto Paredes, N., & Parquet, C. (2007). *Enfermedad de Alzheimer*. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina, 175(1), p. 19-25.
4. Prince, M., et al. *Informe mundial sobre el Alzheimer 2015, las consecuencias de la demencia*. Alzheimer's Disease International, 2015
5. López, M., Sosa, M., & Labrousse, N. (2007). *Síndrome metabólico*. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina 174(1), p. 12.
6. Mendivil, Carlos Olimpo (2005). *Obesidad y síndrome metabólico*. Acta Médica Colombiana, 30(3). Asociación Colombiana de Medicina Interna. Bogotá, Colombia, p. 163-167
7. Crepaldi, G. & Maggi, S. (2006). *El síndrome metabólico: contexto histórico*. Diabetes Voice, 51(1), (Edición especial), p. 8-9.
8. Aguilar-Salinas C, Rojas R, Gómez-Pérez F, Valles V, Ríos-Torres J, Franco A, et al. *High prevalence of metabolic syndrome in Mexico*. Arch Med Res 2004; 35(1), p.76-81.
9. Zimmet, P., Alberti, K., & Serrano Ríos, M. (2005). *Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados*. Revista Española de Cardiología, 58(12), p. 1371-1376. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-8932\(05\)74065-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-8932(05)74065-3).
10. Gázquez Linares, J. (2015). *Salud, alimentación y sexualidad en el envejecimiento (1st ed.)*. [La Cañada de San Urbano, Almería]: Asociación Universitaria de Educación y Psicología.
11. Secretaría de Salud. (2002). *Metformina y Síndrome Metabólico* (p. 13-21). México, D.F.: Manual de uso.

12. Carrillo Esper, R., Sánchez Zúñiga, M., & Elizondo Argueta, S. (2006). *Síndrome metabólico*. Revista de la Facultad de Medicina, 49(3), p. 98-100.
13. González Chávez, A., & Alexánder Rosas, E. (2009). *Consenso mexicano de resistencia a la insulina y síndrome metabólico*. Revista Mexicana de Cardiología, 10(1), p. 3-11.
14. González Sarmiento, E., Pascual Calleja, I., Laclaustra Gimeno, M., & Casasnovas Lengua, J. (2005). *Síndrome metabólico y diabetes mellitus*. Revista Española de Cardiología, 5(10), p. 3-7.
15. Costa, B., Cabré, J., & Martín, F. (2003). *Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y diabetes. ¿Qué se oculta bajo la punta del iceberg?* Aten Primaria, 31(7), p. 436-445.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0212-6567\(03\)79204-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0212-6567(03)79204-x)
16. Alegría Ezquerro, E., Castellano Vázquez, J., & Alegría Barrero, A. (2008). *Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica*. Revista Española de Cardiología, 61(7), p.752-764.
17. *Obesidad* (2017). Organización Mundial de la Salud. Retrieved 24 March 2017, from:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
18. Luengo Fernández, E., Ordóñez Rubio, B., Bergua Martínez, C., & Laclaustra Gimeno, M. (2005). *Obesidad, dislipemia y síndrome metabólico*. Revista Española de Cardiología, 5(21), p. 21-29.
19. Rodríguez Porto, A., Sánchez León, M., & Martínez Valdés, L. (2002). *Síndrome metabólico*. Revista Cubana de Endocrinología, 13(3), p. 238-252.
20. Cordero, A., Moreno, J., & Alegría, E. (2005). *Hipertensión arterial y síndrome metabólico*. Revista Española de Cardiología, 5(38), p.38-45.
21. Song, M., Bischoff, D., Song, A., Uyemura, K., & Yamaguchi, D. (2017). *Metabolic relationship between diabetes and Alzheimer's disease*

- affected by Cyclo(His-Pro) plus zinc treatment.* BBA Clinical, 7(1), p. 41-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.09.003>
22. Frisardi, V., Solfrizzi, V., Seripa, D., Capurso, C., Santamato, A., & Sancarlo, D. et al. (2010). *Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease.* Ageing Research Reviews, 9(4), p. 399-417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.04.007>
23. *El procesamiento proteolítico de la proteína precursora del beta-amiloide (APP)* - Medicina molecular. (2011). Medmol.es. Fecha de consulta: 5 Abril 2017, de http://medmol.es/temas/procesamiento_app/
24. Bernhardt M., R. (2005). *Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer.* Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría, 43(12), p. 123-132.
25. Rius-Pérez, S., Tormos, A., Pérez, S., & Taléns-Visconti, R. (2015). *Patología vascular: ¿causa o efecto en la enfermedad de Alzheimer?* Neurología. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.07.010>
26. Menéndez, S., Padrón Pérez, N., & Llibre Rodríguez, J. (2002). *Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer.* Revista Cubana de Investigación Biomédicas, 21(4), p. 253-261.
27. Carvajal Carvajal, C. (2016). *Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer.* Medicina Legal de Costa Rica - Edición Virtual, 33(2), p. 149-168.
28. García Lara, J., Aguilar Navarro, S., Gutiérrez Robledo, L., & Ávila Funes, J. (2010). *The metabolic syndrome, diabetes, and Alzheimer's disease.* Revista de Investigación Clínica, 62(4), p. 343-349.
29. Frisardi, V., Solfrizzi, V., Seripa, D., Capurso, C., Santamato, A., & Sancarlo, D. et al. (2010). *Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease.* Ageing Research Reviews, 9(4), p. 399-417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.04.007>
30. Chakrabarti, S., Kumar Khemka, V., Banerjee, A., Chatterjee, G., Ganguly, A., & Biswas, A. (2015). *Metabolic risk factors of sporadic*

Alzheimer's disease: Implications in the pathology, pathogenesis and treatment. Aging and Disease, 6(4), p. 282.

<http://dx.doi.org/10.14336/ad.2014.002>

31. Cascales Angosto, M., & González González, P. (2009). *Factores implicados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Estrés oxidativo.* Instituto de España. Madrid, p.193-234

32. Elejalde Guerra, J. (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes.* Canales de Medicina Interna, Madrid, 18(6), p. 50-53. <http://dx.doi.org/10.4321/s0212-71992001000600010>

33. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.* Biochemistry Journal, 219(1), p. 1-14

34. Muñiz, P., Coma, M., & Terán, J. (2014). *Estrés oxidativo y daño vascular en procesos de hipoxia. Malondialdehído (MDA) como biomarcador de daño oxidativo.* Revista Electrónica de Biomedicina, 2(46). <http://dx.doi.org/ISSN:1697-090X>

35. Céspedes Cabrera, T., & Sánchez Serrano, D. (2000). *Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación.* Revista Cubana de Cardiología, 14(1), p. 55-60.

36. Pérez Gastell, P., & Pérez de Alejo, J. (2000). *Métodos para medir el daño oxidativo.* Revista Cubana de Medicina Militar, 29(3), p. 92-98.

37. Céspedes Miranda, E., Hernández Lantigua, I., & Llópez Jane, N. (2006). *Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: Catalasa.* Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria De Girón". Revista Cubana de Investigación Biomédicas, 15(2), p. 18-23.

38. Spevak W, Hartig A, Meindl P, Ruis H. 1986. *Heme control región of the catalase T gene of the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Molecular Genetics and Genomics, 203(1): p. 73-78

39. García Triana, B., García Morales, O., Clapes Hernández, S., Rodes Fernández, L., & García Piñeiro, J. (2011). *Enzimas que participan como*

- barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: Superóxido dismutasas*. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria De Girón". Revista Cubana de Investigación Biomédicas 15(2), p. 8-11.
40. Castillo Casaña, Y., & Riverón Forment, G. (2014). *Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas*. Revista Cubana de Genética Comunitaria, 8(1), p. 5-11.
41. QUIMICA, F.D., Fundamentos y Técnicas. Manual de prácticas Laboratorio de Alimentos 1. 2010, UNAM.
42. De la Fuente González, A., Rodríguez Lozano, J., & Fonseca Capdevila, E. (2007). *Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot)*. Servicio de Dermatología. Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. A Coruña. España. [http://dx.doi.org/10.1016/s0213-9251\(07\)73064-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0213-9251(07)73064-2)
43. Universidad Nacional de Químes, 2012. Western blot. Manual de prácticas. Introducción a la Biología Celular y Molecular.
44. Wiernsperger, N. F. and C. J. Bailey (1999). *The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms*. Drugs 58 Suppl 1: 31(9); discussion p.75-82.
45. Abbasi, F., M. Carantoni, et al. (1998). *Further evidence for a central role of adipose tissue in the antihyperglycemic effect of metformin*. Diabetes Care 21(8): p.1301-1305.
46. Craft, S., Asthana, S., Cook, D., Baker, L., Cherrier, M., & Purganan, K. et al. (2003). *Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype*. Psychoneuroendocrinology, 28(6), p.809-822. [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4530\(02\)00087-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4530(02)00087-2)
47. Evin, G., & Hince, C. (2013). *BACE1 as a therapeutic target in Alzheimer's disease: Rationale and current status*. Drugs & Aging, 30(10), p.755-764. <http://dx.doi.org/10.1007/s40266-013-0099>

48. González, M., Fernández, I., & Bauza, J. (2007). *Indicadores de estrés oxidativo en cerebros de ratas viejas con déficit cognitivo*. Biotecnología Aplicada, 24(2), p.147-150.

49. Valdecantos, M., Pérez-Matute, P., & Martínez, J. (2009). *Obesidad y estrés oxidante: papel de la suplementación con antioxidantes de la dieta*. Revista de Investigación Clínica, 61(2), p.127-139.