



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**EFFECTO DE LA BETANINA EN LOS CAMBIOS DE LA EXPRESIÓN Y
DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES A SEROTONINA 5-HT_{2C} Y 5-HT_{5A} EN UN
MODELO DE RATAS PARA ALZHEIMER INDUCIDO POR DIETA**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA MAGDALENA ERÉNDIRA GONZÁLEZ TELLO

DIRIGIDA POR:

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, CENTRO UNIVERSITARIO
NOVIEMBRE, 2017**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

EFFECTO DE LA BETANINA EN LOS CAMBIOS DE LA EXPRESIÓN Y
DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES A SEROTONINA 5-HT_{2C} Y 5-HT_{5A} EN
UN MODELO DE RATAS PARA ALZHEIMER INDUCIDO POR DIETA

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. MARÍA MAGDALENA ERÉNDIRA GONZÁLEZ TELLO

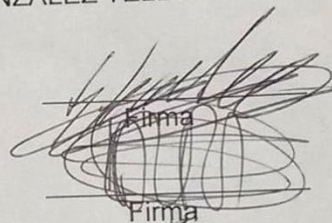
Dra. María Guadalupe García Alcocer
Presidente

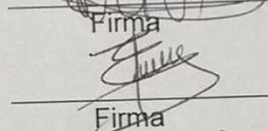
Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Secretario

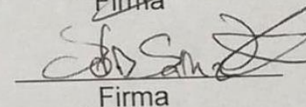
Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Vocal

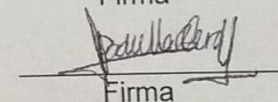
Dr. Juan Carlos Solís Sainz
Suplente

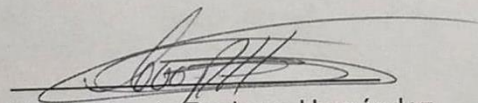
M. en NH. Karla Margarita Padilla Olvera
Suplente

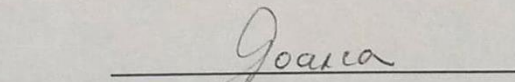

Firma


Firma


Firma


Firma


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario,
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2017

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia, porque ocupa entre el 60% y el 70% de los casos. Las lesiones características más importantes de la EA son la deposición de fibrillas amiloide (placas seniles) y por acúmulos de proteína tau hiperfosforilada (neurofibrillas), presentes en algunas regiones del cerebro y ambos se consideran esenciales para el diagnóstico neuropatológico. Aunque todos los sistemas de transmisión de señales pueden ser alterados de diferentes maneras a lo largo de la evolución de la enfermedad, sobre todo en las últimas etapas, tanto la dopamina como la serotonina han sido fuertemente correlacionadas con las disfunciones cognitivas. Los receptores 5-HT_{2C} se encuentran expresados en neuronas GABAérgicas, glutamérgicas y dopaminérgicas. Se ha propuesto que la búsqueda de su relación en diversas condiciones patológicas puede ofrecer un beneficio terapéutico al modular tanto la expresión de los receptores 5-HT_{2C} como a los receptores 5-HT_{5A} dando como resultado un potencial cognitivo mejorado. Estudios previos han reportado que la proteína β-amiloide daña la actividad redox mitocondrial e induce estrés oxidativo. La betanina es un pigmento natural que presenta propiedades antioxidantes, por lo que juega un papel importante en la captura de radicales libres. Sin embargo, la información sobre el efecto de la betanina hacia los cambios neuropatológicos es poco conocida, debido a que las betaninas pueden mejorar el estrés oxidativo, es importante determinar la eficacia en el mecanismo, para detener el proceso de avance neuropatológico, por lo que podría ser considerada una alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, it accounts for 60 to 70% of the cases. The most prominent neuropathological characteristic injuries of AD are the deposition of amyloid fibers (senil plaques) and accumulation of hyperphosphorylated tau protein (neurofibrillary tangles), present in some regions of the brain, and both are considered essential for neuropathological diagnosis. Although every signal-conveying system can be altered differently along the disease evolution, especially in later stages of it, both dopamine and serotonin have been strongly correlated with cognitive dysfunctions. The 5-HT_{2C} receptors are expressed by GABAergic, glutamatergic, and dopaminergic neurons. It has been proposed that research of its role in several pathological conditions might bring about therapeutic benefit by modulating the expression of both 5-HT_{2C} and 5-HT_{5A} receptors, resulting in improved cognitive potential. Previous studies have reported that the protein β -amyloid impairs mitochondrial redox activity and induces oxidative stress. Betanin is natural pigments which have antioxidant properties therefore playing an important role in capturing free radicals. However, information on the effect of betanin onto neuropathological changes is null. Since betanin can ameliorate oxidative stress, it is important to determine their efficacy on the mechanism to detain the advance of the neuropathological process, so they may be considered an alternative for Alzheimer's disease treatment.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Cambios neuropatológicos en la enfermedad de Alzheimer	2
2.2. Placa β -amiloide	2
2.3. Acúmulos neurofibrilares	6
2.4. Localización, biosíntesis y metabolismo de la 5-hidroxitriptamina	7
2.5. Receptores a serotonina	9
2.6. Relación de los receptores a serotonina en la enfermedad del Alzheimer	12
2.7. Apolipoproteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer	13
2.8. Efecto neuroprotector hacia la enfermedad de Alzheimer	16
2.9. Betanina	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. General	21
5.2. Específicos	21
6. METODOLOGÍA	23
6.1. Reactivos y soluciones	23
6.2. Animales y diseño experimental	23
6.3. Determinación de Colesterol total y triglicéridos	24
6.4. Desarrollo cognitivo y funcional	24
6.5. Inmunihistoquímica	26

6.6. Análisis estadístico	27
7. RESULTADOS	28
7.1. Efecto de la dieta enriquecida con manteca en el colesterol total y triglicéridos	28
7.2. Efecto de la betanina en la memoria a largo plazo evaluado por el laberinto radial de 8 brazos en el modelo de ratas para Alzheimer	30
7.3. Efecto de la betanina en la memoria a corto plazo evaluada por la prueba de reconocimiento de objeto nuevo en el modelo de ratas para Alzheimer	31
7.4. Distribución de los receptores a serotonina 5-HT _{2C} y 5-HT _{5A} en corteza cerebral por inmunofluorescencia	33
8. DISCUSIONES	38
9. CONCLUSIONES	46
10. REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diferentes tipos de acúmulos β -amiloide encontradas en el cerebro humano presentes en la patología de la EA	4
2	Diagrama que muestra cómo se cree que los altos niveles de β -amiloide pueden causar daño sináptico, estrés oxidativo, muerte celular y demencia	5
3	El corte por la β -secretasa genera el extremo N-terminal y el corte intramembranal por la γ -secretasa da lugar al extremo C-terminal de β -amiloide	6
4	Depósitos anormales fibras neurofibrilares formadas por tau	7
5	Síntesis y metabolismo de la 5-hidroxitriptamina	9
6	Esquema representativo de la clasificación de los receptores a serotonina	11
7	Señalización del potencial de serotonina mediada por receptores	12
8	Estructura de la apolipoproteína	15
9	Estructura química de la betanina	19
10	Registro del peso corporal	28
11	Registro del colesterol al inicio y al final del tratamiento	29
12	Registro de triglicéridos al inicio y al final del tratamiento	30
13	Tiempo de reconocimiento de la recompensa en la prueba del laberinto elevado de 8 brazos	31
14	Tiempo de familiarización de la prueba de reconocimiento de objeto nuevo	32
15	Índice de reconocimiento de la de la prueba de reconocimiento de objeto nuevo	32
16	Determinación de unión inespecífica del anticuerpo FITC	33

	Distribución de los receptores 5-HT _{2C} en corteza cerebral.	
17	Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control y de la muestra DEM	34
	Distribución de los receptores 5-HT _{2C} en corteza cerebral.	
18	Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control y de la muestra DEM + 4 mg/Kg de betanina	34
	Distribución de los receptores 5-HT _{2C} en corteza cerebral.	
19	Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control y de la muestra DEM + 25 mg/Kg de betanina	35
	Distribución de los receptores 5-HT _{5A} en corteza cerebral.	
20	Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control y de la muestra DEM	35
	Distribución de los receptores 5-HT _{5A} en corteza cerebral.	
21	Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control y de la muestra DEM + 4 mg/Kg de betanina	36
	Distribución de los receptores 5-HT _{5A} en corteza cerebral.	
22	Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control y de la muestra DEM + 25 mg/Kg de betanina	36

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un tipo de demencia que causa problemas en la memoria, cada año se registran 7.7 millones de nuevos casos, la EA ocupa entre un 60% y un 70% de los casos siendo la principal causa de demencia (OMS, 2017).

En 1906, el psiquiatra Alemán Alois Alzheimer, estudió un cerebro de un paciente que presentaba demencia presenil. Encontró numerosos núcleos miliares en las capas superiores, placas seniles y cambios específicos en las neurofibrillas. Después de 100 años se estableció que las dos patologías importantes en la EA, observadas por Alzheimer, son la deposición de β -amiloide y de la proteína tau hiperfosforilada (Serý *et al.*, 2013). Al paso de los años, su frecuencia ha incrementado y ha pasado de ser una enfermedad rara a ser una de las enfermedades más prevalentes y que más discapacidad produce en la actualidad (García, 2011).

La demencia no es una enfermedad específica, sino que es un término general que se utiliza para describir un conjunto de síntomas que afectan al funcionamiento normal del cerebro, asociados con la disminución de la memoria y otras habilidades de pensamiento que van provocando una disminución en el desarrollo de las actividades diarias de la persona (Alz, 2015). La demencia es progresiva e irreversible, el síndrome clínico tiene varias etiologías con superposiciones patológicas y características clínicas (Cunningham y Passmore, 2013). Los síntomas generales incluyen problemas en la memoria, disminución en la capacidad de aprender, cambios de humor, progresiva pérdida de la conciencia del individuo y problemas de comunicación (Young *et al.*, 2010).

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo asociado con una alteración global de las funciones mentales, la pérdida de la memoria es su principal síntoma. Al progresar la enfermedad se van afectando otras funciones cognitivas, como las habilidades verbales, habilidades visual-espacial y la capacidad para utilizar objetos comunes (Lorenzo *et al.*, 2008). Este trastorno comprende dos tipos: la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (*EOAD, early-onset*) y la esporádica o de inicio

tardío (*LOAD, early-onset*). Los pacientes que presentan la *EOAD* son en cantidad menor en comparación con los de *LOAD* (95% de los pacientes con EA). Ambos tipos de EA se caracterizan por una excesiva acumulación de formas tóxicas de β -amiloides (Tarasoff-Conway *et al.*, 2015). Hasta el momento los fármacos utilizados para esta enfermedad ayudan a mejorar pero no hay cura por lo que es importante implementar moléculas que apoyen a la prevención del EA como la betanina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cambios neuropatológicos en la Enfermedad de Alzheimer

Las lesiones neuropatológicas características más importantes de la EA son la deposición de fibrillas amiloide (placas seniles) y acúmulos de proteína tau hiperfosforilada (neurofibrillas), presentes en algunas regiones del cerebro y ambos se consideran esenciales para el diagnóstico neuropatológico (Bertram, 2007; Acosta-Cabronero y Peter, 2014). Los efectos en dominios genéticos de las mutaciones en la proteína precursora amiloide (APP), en la presenilina-1 (PS1) o en la presenilina-2 (PS2) son los responsables del comienzo temprano o forma familiar de la EA. Se ha visto que en estas mutaciones alteran de manera significativa el metabolismo de la APP, favoreciendo la agregación de β -amiloide dando como resultado la “hipótesis de cascada amiloide” de la patogénesis en la EA (Krstic y Knuesel, 2013).

2.2. Placa β -amiloide

Los péptidos β -amiloide son péptidos producidos de manera incorrecta en el procesamiento de la integración de la proteína de membrana llamada proteína precursora amiloide (APP), y poseen una longitud de 40 a 42 aminoácidos. La función fisiológica de los péptidos β -amiloide en el cerebro normal no está completamente establecida, aunque se conoce que participan de manera importante en la neurogénesis y en la modulación de la plasticidad sináptica (Goeder y Spillantino, 2006; Rajasekhar *et al.*, 2015). En la figura 1 se muestran los tipos de placas β -amiloide que se encuentran relacionadas con la EA en el cerebro humano.

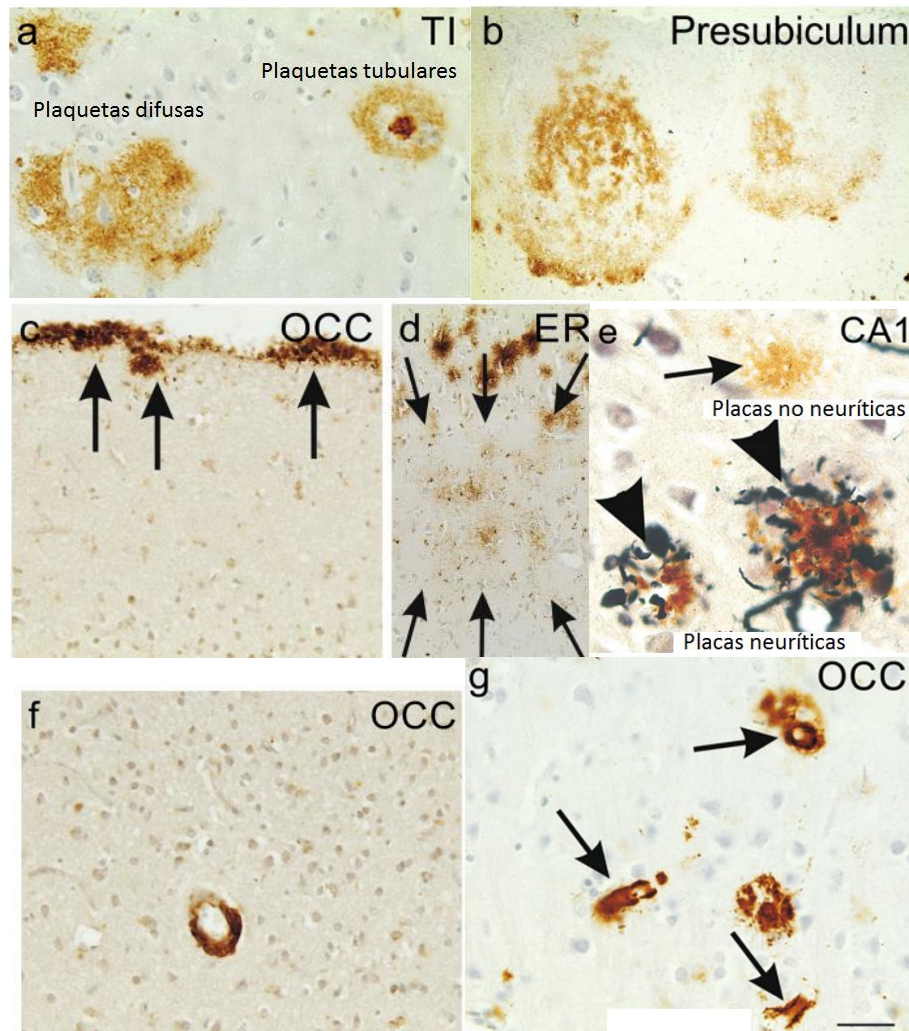


Figura 1. Diferentes tipos de acúmulos de β -amiloide encontradas en el cerebro humano presentes en la patología de la EA. a) placas tubulares y difusas. b) amiloide presubicular. c) amiloide subpial d) placas dispersas. e) placas neuríticas y no neuríticas. f) arteria con deposición β -amiloide en la pared vascular. g) deposición de β -amiloide en un capilar sanguíneo. TI isocorteza temporal, OCC isocortexa occipital, ER corteza entorrinal, CA1 Asta de Ammon (modificado de Thal y *et al.*, 2015).

En la figura 2 se representa un esquema de como la acumulación de β -amiloide comienza antes de la aparición de los síntomas clínicos de la EA. Basado en el grado de la agregación de β -amiloide se puede clasificar como placas difusas y placas tubulares o compactas. Las placas difusas son la forma inmadura de β -amiloide que comprende la forma con menor agregación de β -amiloide. Las placas tubulares o compactas se forman a partir de las placas difusas, se agrupan y dan lugar a un

núcleo. Ambas placas están presentes en la corteza cerebral de pacientes con la EA (Asih *et al.*, 2014).

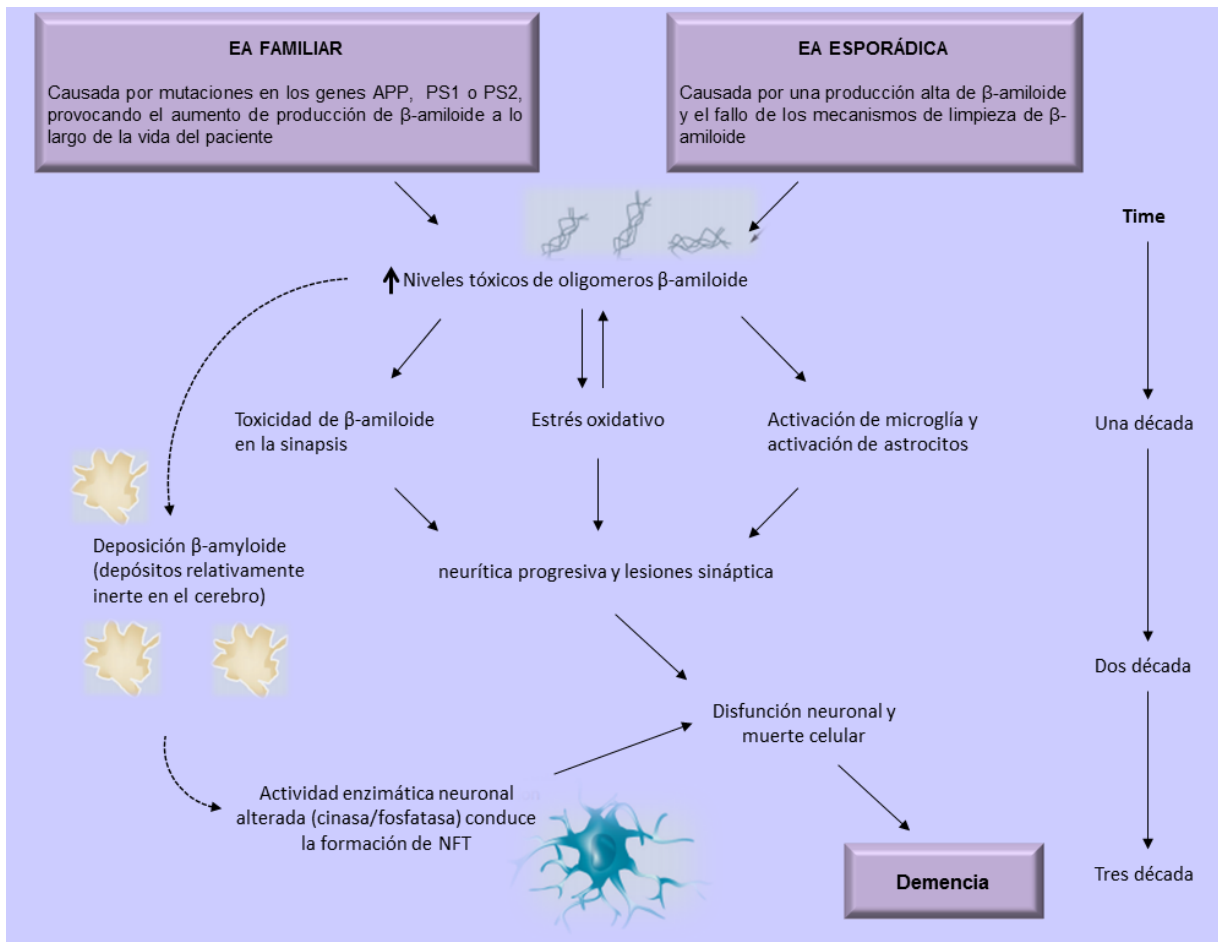


Figura 2. Diagrama que muestra cómo se cree que los altos niveles de β-amiloide pueden causar daño sináptico, estrés oxidativo, muerte celular y demencia (modificado de Asih *et al.*, 2014).

En la vía amiloidogénica del metabolismo de APP, la β-amiloide se forma por la acción secuencial de β- y γ-secretasa, mientras que en la vía no amiloidogénica la enzima α-secretasa no conduce la formación de β-amiloide (Belyaev *et al.*, 2010). El extremo N-terminal de β-amiloide se encuentra localizado en el dominio extracelular del APP y el extremo C-terminal en región transmembranal. Las enzimas que cortan en estas regiones son la β-secretasa y la γ-secretasa, respectivamente. La enzima α-

secretasa corta entre los residuos 16 y 17, la cual evita la formación de β -amiloide (figura 3) (Goeder y Spillantino, 2006).

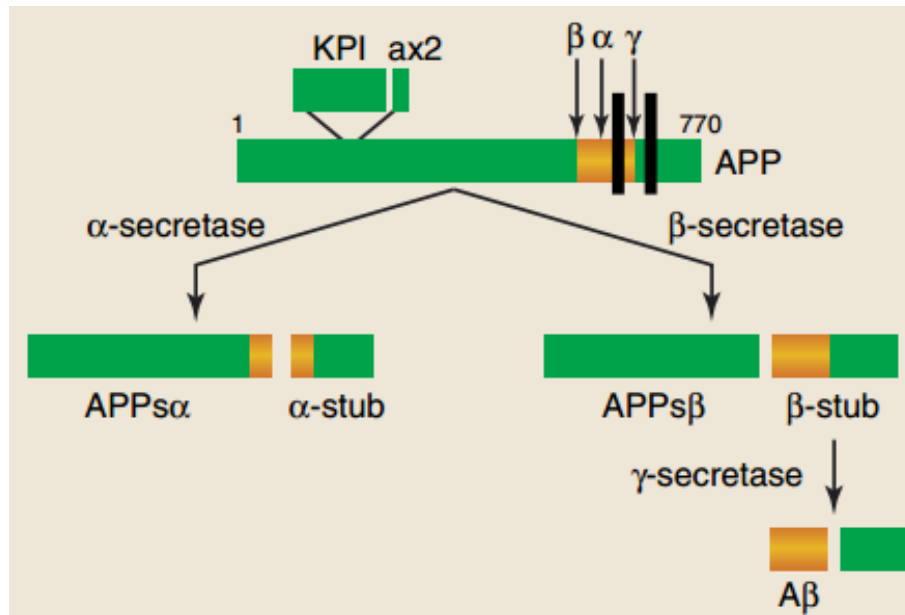


Figura 3. El corte por la β -secretasa genera el extremo N-terminal y el corte intramembranal por la γ -secretasa da lugar al extremo C-terminal de β -amiloide. El corte por α -secretasa no produce β -amiloide (Goeder y Spillantino, 2006).

Se han caracterizado tres isoformas de la APP (APP_{695} , APP_{751} , APP_{770} ; Goedert, 2015), las cuales son producidas por el mecanismo de splicing alternativo de los exones 7 y 8 que codifican a un inhibidor tipo Kunitz de proteinasas (KPI) de una longitud de 56 aminoácidos y otro de longitud de 19 aminoácidos que muestra una similitud en la secuencia del antígeno OX-2 presente en las células linfoides derivadas del timo, respectivamente. La isoforma más larga, APP_{770} , posee los dominios KPI y OX-2, mientras que APP_{751} posee solo el dominio KPI. La isoforma más corta, APP_{695} carece del dominio KPI como del dominio OX-2. En cerebro, se expresa en niveles altos la isoforma APP_{695} y a niveles bajos las isoformas $APP_{751/770}$, sin embargo, se ha sugerido que las isoformas con KPI y sin KPI en determinadas regiones pueden ser un factor importante en la deposición de β -amiloide (Belyae *et al.*, 2010).

2.3. Acúmulos neurofibrilares

Los NFT's (*neurofibrillary tangles*, acúmulos neurofibrilares) son fibras intraneuronales primarias anormales de tau (figura 4), pueden ser visualizados por tinciones histoquímicas o con inmunohistoquímica directa contra los epítopes de tau (fosforilada y no fosforilada) (Hyman *et al.*, 2012), y se extienden desde el citoplasma neuronal a las neuritas. Estas estructuras patológicas no se encuentran en el cerebro normal (Uchihara, 2014) y dependiendo del nivel de la enfermedad se presentan comúnmente en el sistema límbico (entorrinal), en el sistema paralímbico (fusiforme inferotemporal, en el parietal posterior prefrontal (corteza homotípica) y en las áreas primarias sensoriales y motoras (corteza idiotípica) (Peña-Cananova *et al.*, 2012).

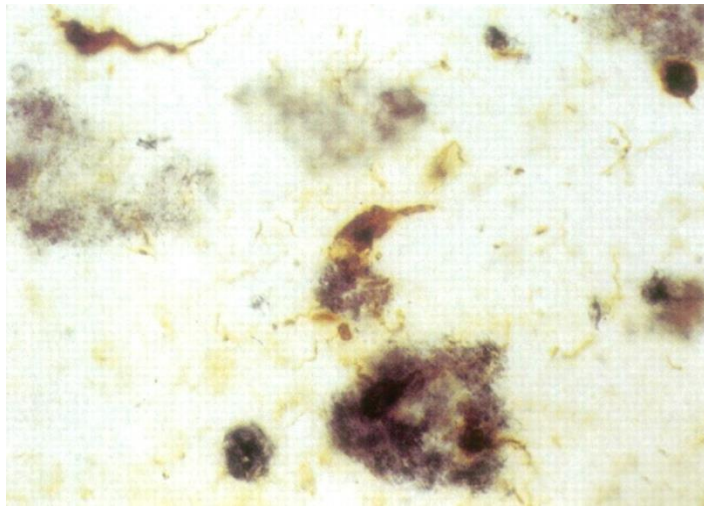


Figura 4. Depósitos anormales fibras neurofibrilares formadas por tau (café) (Goeder y Spillantino, 2006).

La proteína tau estabiliza microtúbulos neuronales, que son los componentes del citoesqueleto por unión a la tubulina, al ser hiperforforilada, tau reduce la capacidad de unirse a microtúbulos. En condiciones normales, la proteína tau es soluble y al ser hiperfosforilada se vuelve insoluble (Gentier y Leeuwen, 2015). La desintegración de

los microtúbulos que conducen a la disrupción del transporte axonal, disminuye las neuritas distales y eventualmente provoca muerte neuronal (Lau y Brodney, 2008).

En el cerebro humano, se han encontrado seis isoformas de tau que se producen a partir de un mismo gen mediante el splicing alternativo del mRNA. Estas isoformas se dividen dentro de dos grupos de acuerdo al número de repeticiones de unión a los microtúbulos, siendo de 3 repeticiones y de 4 repeticiones. En pacientes con la EA tienen expresadas las seis isoformas de tau (Goeder y Spillantino, 2006).

La hipótesis tau sugiere que la fosforilación de tau es el primer factor causante del desarrollo de la EA (Gentier y Leeuwen, 2015). La evolución secuencial de la patología tau y su correlación con la neurodegeneración y manifestación clínica juega un papel importante en la muerte neuronal. La deficiencia cognitiva de la APP en animales transgénicos y efectos tóxicos de β -amiloide, pueden ser reducidos por la eliminación de la expresión de tau (Lau y Brodney, 2008).

Se pueden diferenciar tres tipos de agregados de tau en la EA: pre-acúmulos, hilos de neuropil (NT's; *neuropil threads*) en las dendritas y axones distróficos asociados con placas amiloides en los axones y los NFT's en el cuerpo celular de las neuronas (Gentier y Leeuwen, 2015).

2.4. Localización, biosíntesis y metabolismo de la 5-hidroxitriptamina

Aunque todos los sistemas de transmisión de señales pueden ser alterados de diferentes maneras a lo largo de la evolución de la EA, sobre todo en las últimas etapas, tanto la dopamina como la serotonina han sido fuertemente correlacionadas con las disfunciones cognitivas (Conceição *et al.*, 2012).

La 5-Hidroxitriptamina (5-HT) llamada también serotonina es una amina compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino. Este neurotransmisor se localiza y es sintetizada en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en las

neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central (SNC), mientras que en las plaquetas sólo se almacena por un mecanismo de transporte activo (Flórez, 2008). Se ha estimado que existen aproximadamente 235,000 neuronas serotoninérgicas en humano, localizadas en los núcleos de rafé los cuales son una parte estructural del mesencéfalo y en ratas estas neuronas serotoninérgicas se encuentran en las células multipolares (aprox. 10,000 neuronas). Las neuronas serotoninérgicas se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC en mamíferos en los núcleos de rafé (Mecawi *et al.*, 2014).

La síntesis de la serotonina inicia a partir del aminoácido L-triptófano que proviene de la dieta y es captado por la célula (figura 5); sufre un primer proceso de oxidación en el C5 del anillo indólico por acción de la enzima *triptófano hidroxilasa* que lo convierte en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Posteriormente, el 5-HTP es descarboxilado en la cadena lateral por la enzima L-aminoácido descarboxilasa y convertido en 5-hidroxitriptamina. La serotonina es almacenada en vesículas para proteger su degradación a causa de enzimas intracelulares como la monoaminoxidasa (MAO) (Flórez, 2008).

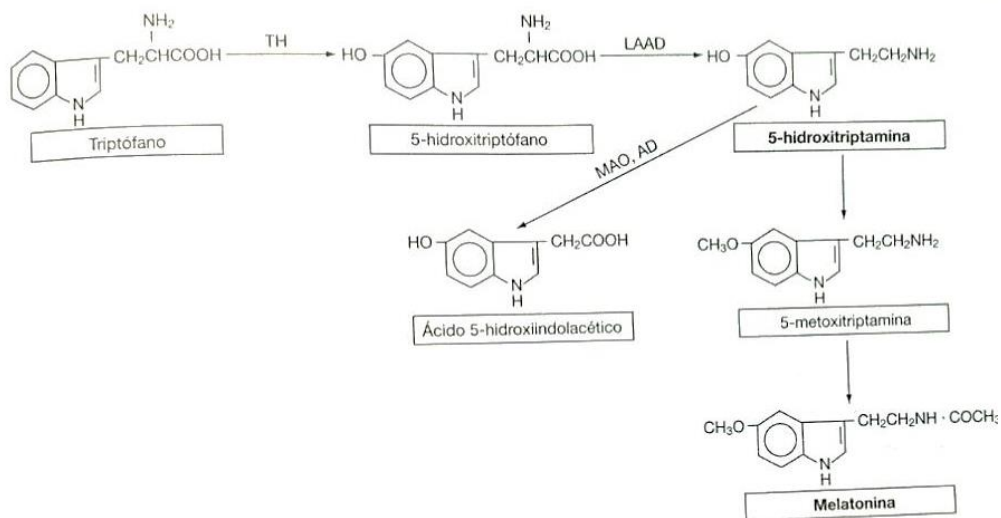


Figura 5. Síntesis y metabolismo de la 5-hidroxitriptamina. AD, aldehído deshidrogenasa; LAAD, L-aminoácido aromático descarboxilasa; MAO monoaminoxidasa, TH, triptófano hidroxilasa (Flórez, 2008).

Numerosos estudios farmacológicos *in vitro* e *in vivo* han demostrado los efectos de la 5-HT, en la regulación en el desarrollo de muchos procesos incluyendo proliferación celular, migración neuronal, crecimiento del cono de motilidad, crecimiento de la neurita, formación de la sinapsis y diferenciación de los fenotipos neuronales (Patel y Zhou, 2005), procesamiento sensorial, control cognitivo, regulación emocional, control autonómico (Olivier, 2015), además se ha visto que juega un papel importante en los desórdenes patológicos en mamíferos (Mecawi, 2014).

2.5. Receptores a serotonina

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, *G-protein-coupled receptors*) han sido estudiados ampliamente en las últimas décadas, participan en varias señales de traducción en la célula además de que están implicados en varias enfermedades. La mayoría de los neurotransmisores llevan a cabo sus funciones a través de estos receptores (Raote *et al.*, 2007). Su clasificación comenzó en 1957, cuando se demostró que las respuestas funcionales del íleon de cobayo podrían estar parcialmente bloqueadas por la morfina, mientras que la Dibenzilina presentaba una respuesta inhibida. Lewis (1960) y Day y Vane (1963) analizaron nuevamente los efectos, y no fue hasta en 1976 cuando recibieron el nombre de receptores 5-HT, con la aplicación de técnicas de unión de radioligando utilizando membranas corticales de rata (Hoyer *et al.*, 2002).

El sistema serotoninérgico consta de 7 tipos de receptores, 5-HT₁₋₇ (figura 6), con un total de 14 subtipos de los cuales son GPCRs y un canal catiónico activado por ligando (receptor 5-HT₃) (Olivier, 2015). En el SNC en humano se encuentran expresados todos los subtipos de receptores a excepción del receptor 5-HT_{5B} y están involucrados en la modulación del ciclo sueño-vigilia, apetito, estado de ánimo, memoria, respiración, la cognición entre otras funciones. La serotonina activa a través de GPCRs las vías de señalización de G α_i , G α_s y G α_q , permitiendo que se modulen varias vías de señalización bioquímicas y que conduce a distintas

respuestas fisiológicas (McCorvy y Roth, 2015) o incluso patologías, incluyendo depresión, trastornos de ansiedad, esquizofrenia, trastornos alimenticios, dolor crónico y otros (Olivier, 2015).

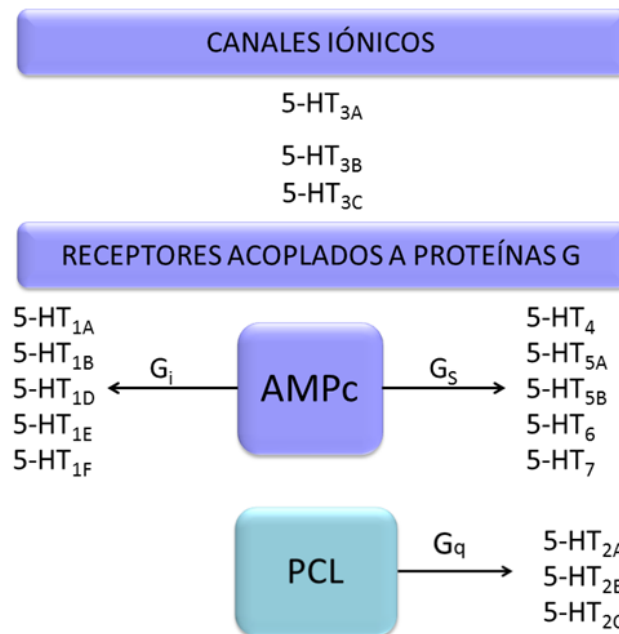


Figura 6. Esquema representativo de la clasificación de los receptores 5-HT (modificado de Hoyer *et al.*, 2002).

Los receptores 5-HT acoplados a proteína $G\alpha_i$ abarcan a la familia del tipo 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F},) y conducen a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa provocando una disminución intracelular del adenosín monofosfato cíclico (AMPC). No existe el receptor 5-HT_{1C} debido a que este subtipo fue re-designado como 5-HT_{2C} por el descubrimiento de su actividad con la subunidad G_q. Se ha sugerido que el receptor 5-HT₅ puede ser una diana terapéutica en los trastornos psiquiátricos, pero hasta la fecha, no existen agonistas selectivos de este subtipo para aclarar su función. En presencia de AMPC, la proteína cinasa A (PKA) es activada y de esta manera regula el flujo de calcio, la excitabilidad de la membrana y a los factores de transcripción sensibles a AMPC, tales como CREB (elemento vinculante a respuesta AMPC). En la figura 7 se muestra un esquema general sobre la participación de los receptores 5-HT en la EA (Xu *et al.*, 2012).

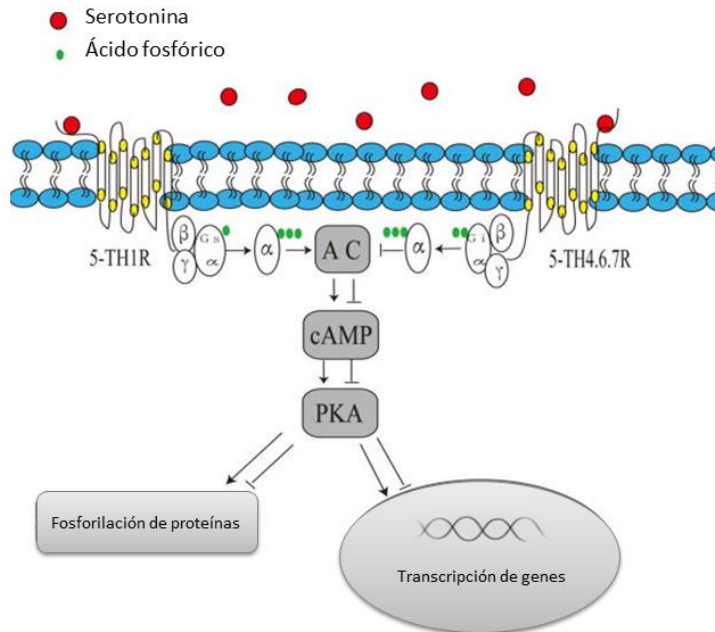


Figura 7. Señalización del potencial de serotonina mediada por receptores (Modificado de Xu *et al.*, 2012).

Los receptores 5-HT acoplados a proteína G_{α_q} están formados por la familia 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}), su característica es la activación de la fosfolipasa C (PLC) desencadenando la producción de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (McCorvy y Roth, 2015).

Los receptores 5HT_{2C} se encuentra ampliamente distribuido en el SNC. Se expresa en una gran variedad de neuronas pero no se ha encontrado en los astrocitos. En numerosas regiones del cerebro es coexpresado junto con la enzima ácido glutámico descarboxilasa localizada en las interneuronas GABAérgicas en la corteza cerebral, en el cuerpo estriado y en la amígdala (Di Giovanni y De Deurwaerdère, 2016), para el tratamiento en varias condiciones incluyendo la obesidad, la ansiedad, la depresión, el desorden obsesivo compulsivo, la esquizofrenia, la migraña y la disfunción eréctil (Lui *et al.*, 2010).

La localización de los receptores 5-HT_{5A} se encuentra en la corteza cerebral, en el hipocampo, en el núcleo accumbens, en la amígdala y en el hipotálamo. Por su amplia distribución en estas regiones se ha estudiado su participación en los cambios

del estado de ánimo, en desordenes afectivo y en funciones cognitivas (Yamazaki *et al.*, 2015).

2.6. Relación de los receptores a serotonina en la enfermedad del Alzheimer

Varios estudios realizados en animales indican que el papel de la 5-HT y sus receptores están involucrados en la disfunción cognitiva que engloba el déficit cognitivo, el aprendizaje y disminución de la memoria (Xu *et al.*, 2012).

El procesamiento amiloidogénico es favorable para el procesamiento de la APP en neuronas, en gran parte debido a una gran cantidad de β -secretasa, y la vía no-amiloidogénica es predominante en otro tipo de células. La presencia de APP puede modular diferencialmente la activación de ciertos receptores como los receptores a serotonina, por ejemplo el receptor 5-HT₄, receptores metabotrópicos de glutamato, receptores muscarínicos y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta. La señalización río debajo de estos receptores regulan la secreción de APP, α y β -amiloide por activación de moléculas intermediarias incluyendo PKC, PKA, fosfatidilinositol-3-cinasa, proteína cinasa activada por mitogéno, cinasa reguladora de señal extracelular, Src tirosin cinasa, Rac pequeño GTPasa, inositol-1,4,5-trifosfato, AMPc y calcio (Thinakaran y Koo, 2007).

En un estudio inmuistoquímico de los receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo de pacientes con la EA realizado por (Mizukami *et al.*, 2011) encontraron que este receptor puede contribuir en la disminución cognitiva debido a que se ven afectados por los NFT's. Sus resultados indicaron que la expresión de los receptores 5-HT_{1A} sólo se ven alterados en la etapa final de la EA, su disminución reflejó la pérdida neuronal regional.

En estudios realizados por Noristani *et al.*, (2011) se demostró que hay un incremento en la densidad de las terminales serotoninérgicas en hipocampo observado en un modelo triple transgénico de ratón para la EA. Como resultado

encontraron un aumento en la densidad del transportador de serotonina (SERT), por lo que pudiera estar actuando como un mecanismo de compensación, para mantener la eficacia sináptica en respuesta al deterioro cognitivo de la EA.

2.7. Apolipoproteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer

A principios de 1990 se comenzó a vincular la apolipoproteína E (ApoE) con la EA, La evidencia actual apoya a las isoformas codificadas de la ApoE como moduladores de la agregación y aclaramiento de β -amiloide (Wolf *et al.*, 2013). En otro estudio se reportó que las placas seniles eran bastante frecuentes en el cerebro de pacientes no dementes que habían muerto de cardiopatía coronaria con altos niveles de colesterol (Soares y Sparks, 2008).

La ApoE es una glicoproteína ácida de 299 aminoácidos y de 34kDa con dos dominios funcionales principales: dominio N-terminal con un haz de cuatro α -hélice que contiene la región principal del receptor de unión a lípidos, y el dominio C-terminal. Cuando no se encuentra unida a lípidos, los dominios N-terminal y C-terminal, están unidos por una región bisagra flexible (Wolf *et al.*, 2013). Las caras hidrofóbicas y las caras hidrofílicas opuestas de estas hélices le permiten a la ApoE intercambiarse dependiendo de los estados de lípidos libres o lípidos asociados y explicar su actividad capaz de solubilizar moléculas lipofílicas (figura 8) (Hauser *et al.*, 2011).

Genéticamente, el alelo ApoE ϵ 4 se asocia con mayor riesgo a la EA (Wolf, 2013). La importancia de la ApoE en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol celular es importante (Hauser *et al.*, 2011). La función primaria de ApoE en el cerebro es el tráfico de colesterol y otros lípidos. El cerebro es uno de los órganos ricos en colesterol y contiene el 25% del colesterol total del cuerpo. Mientras que el cuerpo maneja el metabolismo del colesterol principalmente en el hígado, el compartimiento del colesterol cerebral es esencialmente aislado en cuerpos de colesterol por la barrera hematoencefálica (Soares y Sparks, 2008). Entre otras apolipoproteínas que

también están presentes en el SNC son la ApoJ, ApoD, ApoA-1 y ApoA-IV (Hauser *et al.*, 2011).

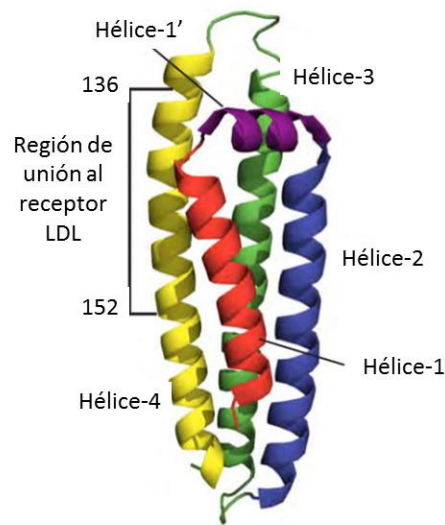


Figura 8. Estructura de la apolipoproteína (modificado de Hauser *et al.*, 2011).

En condiciones normales los astrocitos en el adulto son fuente importante de ApoE (3%), mientras que la microglía y las neuronas producen cantidades mucho más pequeñas de apoE. Una vez sintetizado, es secretada por astrocitos y atrapa al colesterol y otros lípidos a través del transportador dependiente de la unión de ATP (ABCA1), para formar partículas de lipoproteínas antes de ser endocitados por las neuronas, principalmente a través de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y del receptor relacionado a LDL-1 (LRP1). La ApoE es producida en cantidades bajas pero aumenta significativamente como respuesta a la lesión o el estrés (Wolf *et al.*, 2013).

Dentro de la célula neuronal, el colesterol se distribuye de manera desigual entre las bicapas citofacial (superficie externa) y exofacial (superficie interna) de la membrana plasmática, localizando el 70% del colesterol en la superficie citofacial. Durante el desarrollo los niveles de colesterol van aumentando dentro de la superficie exofacial, presentando niveles altos en el envejecimiento (Soares y Sparks, 2008). Se ha visto que la ApoE4 es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de la EA, tanto de inicio temprano y tardío. Se ha observado en un modelo de ratón con EA que la

ausencia de ApoE reduce drásticamente la carga amiloide sin afectar la producción de β -amiloide. Se ha propuesto que la ApoE puede contribuir a la conversión de β -amiloide a sus formas oligoméricas o fibrilares más tóxicos (Hauser *et al.*, 2011).

El uso transportadores de colesterol utilizados en periferia también se han identificado en el cerebro como el transportador dependiente de la unión de ATP (ABCA/ABCG) y proteínas Neimann-Pick C. Los miembros de la familia de los receptores-LDL median principalmente la vía endocítica del colesterol. La recaptación y flujo de salida del colesterol se muestra en la figura 9, donde se resume un modelo hipotético del cerebro y la vía de transporte de colesterol. Cuando es necesario, los astrocitos proporcionan una porción significativa de colesterol a las neuronas por exportación con ayuda de los transportadores ABCA. La ApoE se une a partículas de LDL-colesterol y entra a las neuronas por medio de los receptores de la familia de las LDL, cada célula puede expresar diferentes miembros de la familia LDL. La unión a LRP1B se cree que induce la asociación de la APP con la α -secretasa que favorece la generación de fragmentos no amiloidogénicos, sin embargo, la unión con FE65 provoca el tráfico de APP en los endosomas. Finalmente, la unión del receptor ApoE2 se asocia con X11 α/β que estimula la formación de los productos de β -secretasa y γ -secretasa, por lo que esta variante de la proteína ApoE4 se encuentra más relacionada con el aumento de la producción de β -amiloide y por consecuencia, a un mayor riesgo de EA (Soares y Sparks, 2008).

El colesterol se recicla a la membrana, mientras que β -amiloide se segrega a las vías degradativas. El exceso de síntesis de β -amiloide puede provocar mutaciones en el receptor sortilin/SorLA o disminución en su expresión, y el exceso de colesterol puede estimular la síntesis de péptidos β -amiloide y aumento de tau fosforilada (por inhibición de la vía Reelin (ApoE2-GSK3). El colesterol neuronal que ya no se dirige al reciclaje en los endosomas se metaboliza por el citocromo P46A1 (CYP46A1) a 24S-hidroxicolesterol. Este metabolito estimula la expresión del receptor X del hígado (LXR, *liver X receptor*), induce procesos inflamatorios, liberación de proteínas de fase

aguda y aumenta de la síntesis de ApoE, ABCG, ABCA que están implicados en el transporte de β -amiloide (Soares y Sparks, 2008).

2.8. Efecto neuroprotector hacia la enfermedad de Alzheimer

Estudios previos han reportado que la proteína β -amiloide daña la actividad redox mitocondrial e induce estrés oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y especies reactivas de nitrógeno, tal como el óxido nítrico (NO) y peroxinitrilo. Las células mantienen una homeostasis controlada al estrés por la participación de enzimas antioxidantes, incluyendo la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa, entre otras. El aumento del estrés oxidativo y activación de la vía de apoptosis juegan un papel importante en la modulación de muerte neuronal, por inducción de β -amiloide (Thummayot *et al.*, 2014).

Badshah *et al.*, (2015) estudiaron el efecto neuroprotector de las antocianinas extraídas de la soya negra en un modelo neurodegenerativo de rata inyectado con β -amiloide (1-42). Los resultados publicados de este estudio observaron que las antocianinas invierte el efecto de la proteína β -amiloide en la expresión de las proteínas relacionadas con la vía apoptótica mitocondrial (Bax, citocromo C, caspasa-9, caspasa-3) y en los marcadores de la EA (β -amiloide, APP, proteína tau, BACE-1), por lo que concluyeron que los compuestos antioxidantes son candidatos potenciales para el tratamiento de enfermedad neurodegenerativas.

El trabajo realizado por Subash *et al.*, (2015) investigaron que la suplementación dietética de 2% y 4% de frutos de la palma datilera reduce los déficits cognitivos y de comportamiento utilizando un modelo de ratón transgénico para APP (Tg2576). Los ratones transgénicos estándar, mostraron una disminución significativa de la memoria, aumentando el comportamiento relacionado con la ansiedad y deterioro grave en la capacidad de aprendizaje espacial, discriminado y la coordinación

motora. Los modelos transgénicos con la dieta rica de dátiles redujeron significativamente los niveles de β -amiloide, siendo mayor la dieta con 4% de dátiles en comparación con la del 2%. Estos resultados sugieren que compuestos fenólicos de las frutas pueden tener efectos en la reducción del riesgo, retrasar la aparición o detener la progresión de la EA.

El grupo de investigación de Mao *et al.*, (2015) caracterizaron el efecto del antioxidante schisandrin C, aislado de las frutas de *Schisandra chinensis*, en el deterioro de la memoria debido a los cambios patológicos en ratones inducido con la EA por inyección de β -amiloide (1-42). Sus resultados mostraron que la lesión neuronal se revirtió notablemente después del tratamiento con schisandrin C. Además, se vieron aumentados los niveles de SOD y glutatión peroxidasa (GSH-Px) en el hipocampo y corteza cerebral.

2.9. Betanina

Las betalaínas son pigmentos naturales y su estructura básica está conformada con el ácido betalámico y un cromóforo. De acuerdo a los residuos de ácido betalámico se pueden dividir en dos grupos: las betacianinas (rojo-violeta, $\lambda=540\text{nm}$) y las betaxantinas (amarillo, $\lambda=480\text{nm}$). La betanina (betanidin-5-O- β -glucósido) es la más abundante de las betacianinas (figura 9). Entre las plantas donde se encuentra de manera abundante son remolacha amarilla (*B. vulgaris* L.), el higo (*Opuntia ficus-indica*), la pitahaya o pitaya (*Hylocereus* sp.), las acelgas (*B. vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. *brightlights*), el olluco (*Ullucus tuberosus*) y el amaranto (Esatbeyoglu *et al.*, 2014).

La betanina presenta propiedades antioxidantes y es el único aprobado para ser utilizado como colorante de alimentos. Estos compuestos son importantes marcadores quimiotaxonómicos y no han sido encontrados conjuntamente con las antocianinas en la misma planta (Stintzing, 2004). Además las betalaínas han sido

estudiadas por su efecto antioxidante, quimiopreventivo y anti-inflamatorio (Suh *et al.*, 2014).

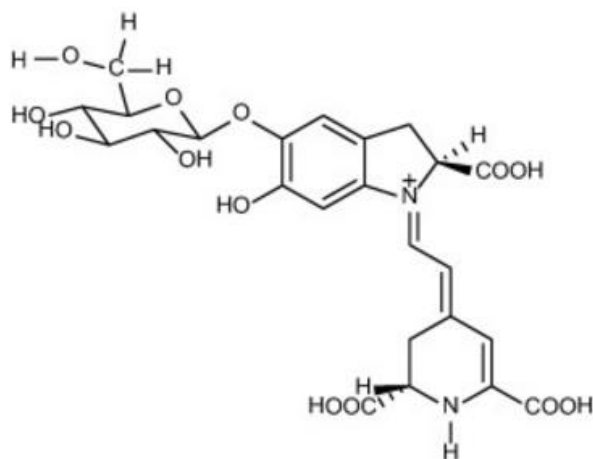


Figura 9. Estructura química de la betanina (Esatbeyoglu *et al.*, 2014).

La EA ha sido asociada con efecto oxidante por lo que es importante el estudio realizado por Taira *et al.*, (2015), donde evaluaron la capacidad antioxidante de los derivados de betacianinas, las cuales fueron la betanina, la filocactina y la betanidina utilizando el índice de capacidad de eliminación de radicales libres generados en presencia de 2,20-Azobis(2-metilpropano-amidina)dihidrocloruro (AAPH) y 4-etil-2-hidroxiamino-5-nitro-3-hexenamida (NOR3) como donador de NO. Sus resultados indicaron que estos compuestos naturales, presentan una fuerte capacidad antioxidante, por lo que se propone que son compuestos útiles para proporcionar una defensa contra el estrés oxidativo.

El cerebro es altamente susceptible a sufrir daños provocados por el estrés oxidativo. En la EA, los radicales libres alteran la permeabilidad de la membrana, generan radicales libres por interacción con los ácidos grasos y cambian funciones de las proteínas, todo esto provoca cambios que conducen a daños irreversibles (Ortiz *et al.*, 2017). Por lo tanto, al buscar disminuir la formación de radicales libres, provenientes del alto metabolismo o provocados por β -amiloide, con compuestos antioxidantes podría disminuir el avance del daño cognitivo en pacientes con la EA.

3. JUSTIFICACIÓN

La disfunción cognitiva es una de las características más típicas de diversas enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado que la apoptosis neuronal y las respuestas inflamatorias se encuentran involucradas en la patogénesis de la disfunción cognitiva, presentando un impacto significativo en la modulación de receptores. La modificación de estos receptores 5-HT relacionados con la memoria pueden estar asociados con la formación de la placa amiloide y de la hiperfosforilación de Tau provocando estrés oxidativo, lo que resulta en el deterioro cognitivo (Xu *et al.*, 2012). En la actualidad, las opciones de tratamiento disponibles para retrasar la aparición o detener la progresión de la EA no son eficaces (Subash, 2015).

Se ha propuesto que los receptores 5-HT en diversas condiciones patológicas pueden ofrecer un beneficio terapéutico, al mejorar la cognición y la memoria, por la modulación de la expresión de los receptores 5-HT_{2C}, como a los receptores 5-HT_{5A} dando como resultado un potencial cognitivo mejorado (Jensen *et al.*, 2010).

La actividad antioxidante de productos naturales es de alta importancia, ya que son ricos en compuestos que participan en la captura de radicales libres (Kim *et al.*, 2011). Sin embargo, la información sobre el efecto de las betaninas hacia los cambios neuropatológicos no se ha estudiado. Debido a que las betaninas pueden mejorar el estrés oxidativo, es importante determinar la eficacia en el mecanismo para detener el proceso de avance neuropatológico, por lo que podría ser considerada una alternativa para el tratamiento de la enfermedades de Alzheimer.

4. HIPÓTESIS

La betanina ejerce un cambio en la expresión y distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} en un modelo de ratas para Alzheimer inducido por dieta.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Determinar el efecto de la betanina en la expresión y distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} en un modelo de rata para Alzheimer inducido por dieta alta en colesterol.

5.2. ESPECÍFICOS

- Determinar los niveles de colesterol en el modelo en rata para Alzheimer inducido por dieta en ratas control, compararlas con el modelo de Alzheimer y con los tratamientos de 4 y 25 mg de betanina.
- Determinar los niveles de triglicéridos en el modelo en rata para Alzheimer inducido por dieta en ratas control, compararlas con el modelo de Alzheimer y con los tratamientos de 4 y 25 mg de betanina.
- Evaluar el aumento de peso corporal en el modelo en rata para Alzheimer inducido por dieta en ratas control, compararlas con el modelo de Alzheimer y con los tratamientos de 4 y 25 mg de betanina.
- Evaluar el deterioro cognitivo en memoria a corto plazo utilizando la prueba de reconocimiento de objeto nuevo en ratas control, compararlas con el modelo de Alzheimer y con los tratamientos de 4 y 25 mg de betanina..
- Evaluar el deterioro cognitivo en memoria a largo plazo utilizando el laberinto elevado de ocho brazos en ratas control y compararlas con el modelo de Alzheimer.
- Determinar la distribución del receptor a serotonina 5-HT_{2C} en corteza cerebral en ratas control y compararlas con el modelo de Alzheimer utilizando la técnica de inmunofluorescencia en el modelo de rata para Alzheimer.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales y reactivos

- Betanina, Sigma-Aldrich (CDS000584).
- Anticuerpo primario contra el receptor 5-HT_{2C} de conejo (SantaCruz Technologies).
- Anticuerpo primario contra el receptor 5-HT_{5A} de conejo (SantaCruz Technologies).
- Anticuerpo secundario anticonejo, FITC (SantaCruz Technologies).

6.2. Animales y diseño experimental

Las Ratas hembra Wistar (6 meses, n=32) fueron adquiridas en el bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se dividieron en cuatro grupos manteniendo una temperatura de 24°C y un ciclo luz oscuridad (12 h/12h). Los grupos consistieron en control, dieta enriquecida con manteca (DEM), DEM+ 4 mg/Kg de betanina y DEM+ 25 mg/Kg de betanina.

Una vez que las ratas fueron separadas en grupos se les dejó 7 días como período de adaptación en las que fueron alimentadas con RodentLab Chow 5001 por una semana. Una vez transcurrido este tiempo las ratas se dividieron de manera aleatoria en cuatro diferentes grupos y cada grupo fue distribuido en dos cajas de policarbonato. El alimento y el agua en todos los grupos fueron *ad libitum* en todo el experimento. Las ratas de los grupos tratados fueron alimentadas con DEM durante un período de 6 meses.

La dieta para el grupo control consistió únicamente en ser alimentadas con Rodent LabChow 5001 (Purina) *ad libitum*. En cuanto a la dieta enriquecida con manteca se adicionó al alimento Rodent LabChow el 33.3% de manteca de cerdo (Anderson *et*

al., 2013; Ullrich *et al.*, 2010). Los animales se alimentaron con esa dieta durante seis meses y se pesaron cada mes durante el experimento. La administración del tratamiento con 4 y 25 mg/Kg de betanina corresponde al estudio previo realizado por Han *et al.*, (2014), fue a través de los bebederos. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento las ratas fueron anestesiadas, decapitadas y perfundidas con PBS 1X y luego fijadas con paraformaldehído al 4%.

El manejo adecuado de los animales de experimentación se llevó de acuerdo a lo establecido en la norma NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

6.3. Determinación de colesterol total y triglicéridos

Para realizar la medición, primero se limpió la cola, con ayuda de una aguja estéril se realizó un piquete en la vena lateral. Se desechó la primera gota de sangre y a partir de la segunda se recolectó en la tira reactiva Accutrend® GCT de colesterol y otra gota para la tira de triglicéridos hasta que se cubrió perfectamente la almohadilla e inmediatamente se colocó en el equipo para realizar la lectura. Al inicio y final del tratamiento se realizó la medición de colesterol total y triglicéridos con el uso de tiras reactivas.

6.4. Desarrollo cognitivo y funcional

El desarrollo cognitivo y funcional fue monitoreado al inicio del tratamiento y después de cada 3 meses hasta el término del tratamiento. Las pruebas cognitivas que se utilizaron en este trabajo fue la prueba del reconocimiento de objeto nuevo y la prueba de laberinto radial de 8 brazos.

La prueba del laberinto de 8 brazos se llevó a cabo en un equipo que consta de una plataforma radial con ocho brazos de 30 cm x 7 cm cada rodeados por paredes de 50cm y elevado a 50 cm del suelo. Para cada ensayo, las ratas se mantuvieron con

restricción de agua. En uno de los brazos se colocó un bebedero (recompensa) y, en las puertas de entrada a cada brazo, un objeto característico. En la fase de pre-habitación, habituación y prueba se siguió el mismo procedimiento, se colocó la rata en el brazo de inicio y se midió el tiempo en el que tardó en llegar al brazo con la recompensa, en un tiempo determinado de 5 min. El tiempo en el que se realizaron las fases fue de 3 meses y se midieron por triplicado. Para cada experimento se limpió perfectamente el laberinto utilizando un limpiador desodorizante.

La prueba de reconocimiento de objeto nuevo (modificado de Antunes y Biala, 2012) consiste en colocar a la rata en el uso de un campo abierto de 1m X 1m X 30 cm. Consta de tres fases: pre-habitación, habituación y prueba. En la fase de pre-habitación se dejó a la rata que explorara libremente en el campo durante 5 min. En la fase de familiarización, se dejó nuevamente a la rata durante 5 min en el campo con la diferencia de que en este momento se colocaron dos objetos iguales acomodados en dos esquinas opuestas. Se registró el tiempo de interacción (segundos) con los dos objetos, el tiempo fue válido en el momento que acercó la nariz a menos de 1 cm de distancia del objeto y sin subirse o morder el objeto. El tiempo de descanso entre la fase de habituación y la fase de prueba fue de 2h. En la fase de prueba, se cambió un objeto y se colocó otro diferente. Se registró el tiempo de interacción entre ambos objetos durante 5 min. La elección de explorar el nuevo objeto refleja el uso de procesos de memoria de reconocimiento a corto plazo. Entre el cambio de rata se limpió perfectamente el laberinto utilizando un limpiador desodorizante.

El índice de reconocimiento (RI) es el tiempo relativo en el cual la rata estuvo explorando el objeto nuevo y se calculó con la siguiente ecuación: $RI = T_N / (T_N + T_F)$, donde T_N corresponde al tiempo del objeto nuevo y T_F corresponde al tiempo del objeto familiar.

6.5. Inmunoistoquímica

El siguiente desarrollo experimental fue llevado a cabo de acuerdo al estudio reportado por López-Esparza (2014). Para el sacrificio, las ratas fueron anestesiadas con 40 mg/Kg de pentobarbital sódico vía intraperitoneal y por perfusión cardiaca se inyectó 60mL de *p*-formaldehído al 4%. Los encéfalos se pusieron en una solución de *p*-formaldehído al 4% durante 8h a 4°C. Posteriormente se enjuagaron los encéfalos en PBS 1X y se colocaron en una solución de sacarosa al 30% a 4°C por dos días. Terminado este tiempo, los encéfalos se cortaron de manera coronal y se colocaron en una caja de aluminio, la cual se pusieron un medio de congelación, una vez congelados se sacaron y se almacenaron en el ultracongelador hasta su uso.

Los cortes se realizaron con un espesor de 12 μm de grosor de los tejidos utilizando el criostato Leica CM 1850®, por cada laminilla se pusieron 4 cortes y se guardaron a -20°C hasta su uso.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo en una cámara húmeda. El primer paso consistió en realizar 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente, se adicionaron 300 μL de la solución bloqueadora (BSA al 1%) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente, cuidando de cerrar perfectamente la cámara. Se volvieron a realizar 3 lavados con PBT al 0.5% de 10 minutos cada uno. Se agregó a cada laminilla 300 μL de una dilución de anticuerpo primario para 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} realizados en conejo. La laminilla “blanco” sólo se le adicionó 300 μL de PBT al 0.5%. En cuanto a la laminilla control se siguió el mismo procedimiento, sólo que no se le adicionó el anticuerpo primario ni secundario. El anticuerpo primario se dejó incubar a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBT al 0.5% de 10 minutos cada uno. A todas las laminillas (muestras y blanco) se les adicionó 300 μL de una dilución del anticuerpo secundario fluorescente, se dejó incubar por 2 horas. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBT al 0.5%. Cada laminilla se les colocó una

gota de glicerol y un cubreobjetos. Se observaron a través del microscopio, los resultados fueron documentados con microfotografía utilizando una cámara Axiocam MRc Zeiss.

6.5.1. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como media \pm error estándar. La diferencia significativa fue analizada mediante la prueba de ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni utilizando el programa estadístico GraphPrism 6.0.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de la dieta enriquecida con manteca en el colesterol total y triglicéridos.

El registro del peso corporal se realizó cada mes durante los 6 meses del tratamiento. La media del peso corporal del grupo DEM (424 g), DEM+4 mg/Kg betanina (422 g) y DEM+25mg/Kg betanina (436 g) incrementó de manera significativa ($p < 0.05$) a partir del primer mes en comparación con la media del peso corporal del grupo control (328 g). Los grupos con tratamiento de betanina de 4 mg/kg y de 25 mg/Kg no mostraron diferencia significativa en el peso comparado con el grupo DEM (figura 10).

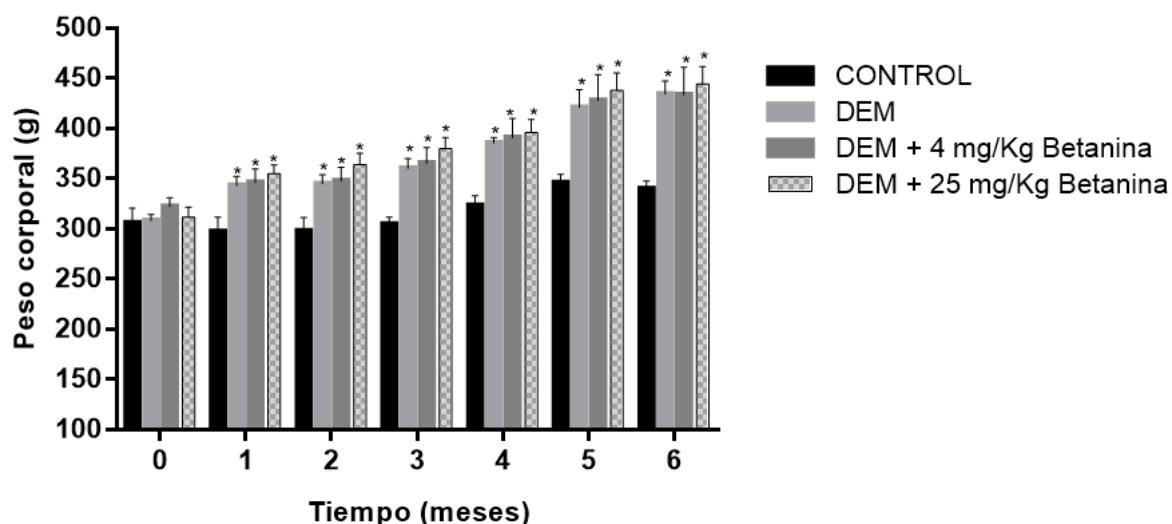


Figura 10. Registro del corporal del peso. El peso fue medido cada mes durante los 6 meses del tratamiento para ir registrando el aumento debido a la ingesta de la DEM. Los valores corresponden a la media \pm error estándar, diferencia significativa $*P \leq 0.05$. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* de Bonferroni.

La determinación de colesterol total y de triglicéridos se midió al inicio y al final del experimento. Las medias de los niveles de colesterol total en los grupos DEM (157.9 mg/dL), DEM + 4 mg/Kg de betanina (157.5 mg/dL) y DEM + 25 mg/kg de betanina

(156.5 mg/dL) no mostraron diferencia significativa ($p < 0.005$) comparando con el control (160.6 mg/dL) al finalizar el experimento a los 6 meses (figura 11).

La media de los niveles de triglicéridos (figura 12) se encontró un aumento significativo ($p < 0.005$) en los grupos DEM (381 mg/dL), DEM + 4 mg/Kg de betanina (392 mg/dL) y DEM + 25 mg/kg de betanina (398 mg/dL) comparado con el control (270 mg/dL). Sin embargo, el tratamiento con betanina no afectó los niveles de triglicéridos en los grupos administrados con 4 y 25 mg/Kg en comparación con el grupo DEM.

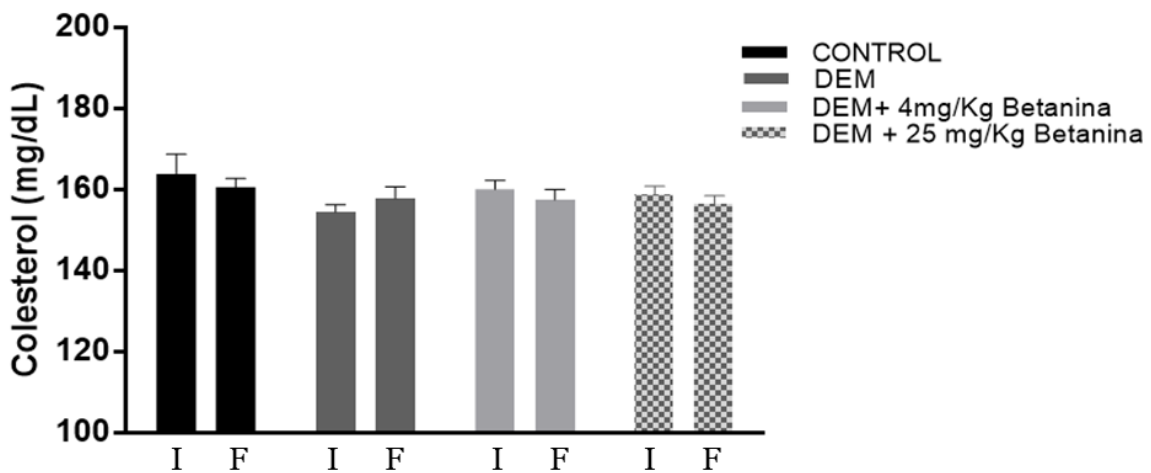


Figura 11. Registro de colesterol al inicio y al final del tratamiento. La primera barra de cada grupo corresponde a los valores iniciales (I) y la segunda barra al valor al finalizar el tratamiento (F). Los valores corresponden a la media \pm error estándar, diferencia significativa ($*P \leq 0.05$). ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* de Bonferroni.

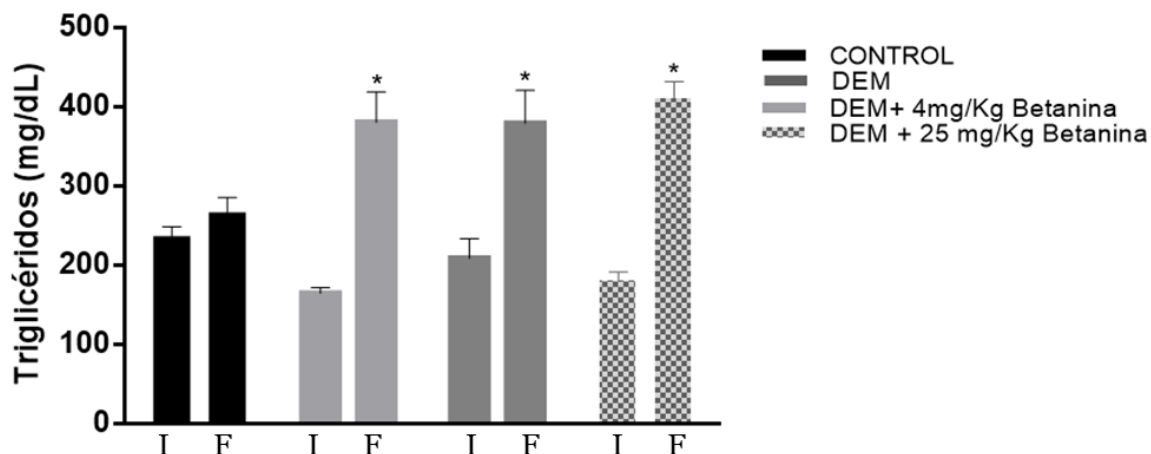


Figura 12. Registro de triglicéridos al inicio y al final del tratamiento. La primera barra de cada grupo corresponde a los valores iniciales (I) y la segunda barra al valor al finalizar el tratamiento (F). Se encontró diferencia significativa en los grupos alimentados con una DEM en comparación con el control. Los valores corresponden a la media \pm error estándar, diferencia significativa ($*P \leq 0.05$). ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* de Bonferroni.

7.2. Efecto de la betanina en la memoria a largo plazo evaluado por el laberinto radial de 8 brazos en el modelo de ratas para Alzheimer

La media en el tiempo de reconocimiento de la recompensa en la fase de prueba entre los grupos administrados con DEM (169.3 mg/dL), DEM + 4 mg/Kg de betanina (169.9 mg/dL) y DEM + 25 mg/Kg de betanina (165.0 mg/dL) no se encontró diferencia significativa comparada con el control (149.7 mg/dL) en las tres fases (pre-habitación, habitación y prueba). En la figura 13 se muestra el tiempo de reconocimiento por los diferentes grupos. Los resultados que obtenidos fueron realizados por triplicado en cada fase (pre-habitación, habitación y prueba).

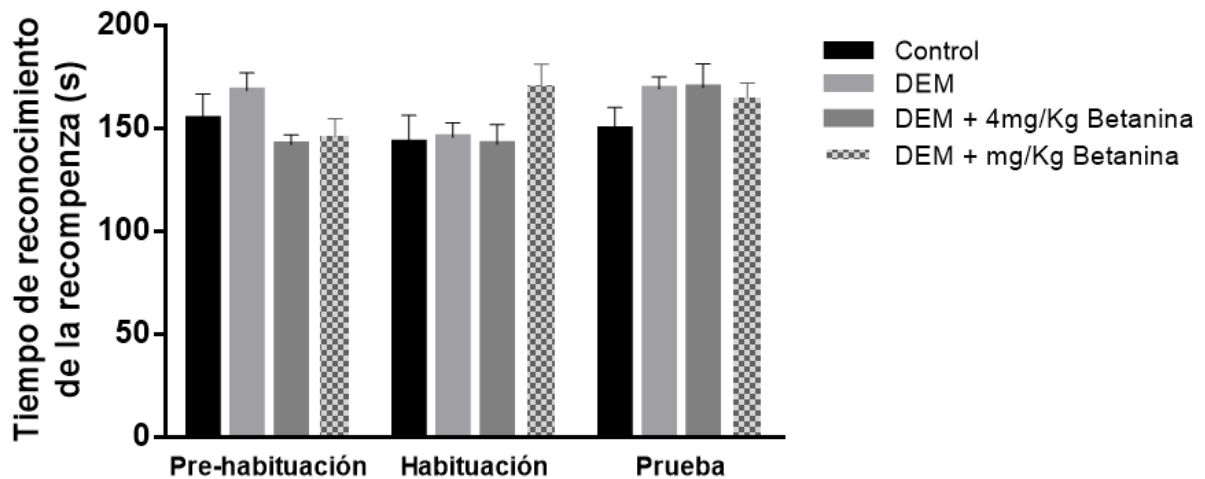


Figura 13. Tiempo de reconocimiento de la recompensa en la prueba del laberinto elevado de 8 brazos. No se encontró diferencia significativa entre los grupos DEM comparación con el control. Los valores corresponden a la media \pm error estándar, diferencia significativa ($*P \leq 0.05$). ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* de Bonferroni.

7.3. Efecto de la betanina en la memoria a corto plazo evaluada por la prueba de reconocimiento de objeto nuevo en el modelo de ratas para Alzheimer

La prueba reconocimiento de objeto nuevo nos permite evaluar el deterioro de memoria a corto plazo, en el modelo de inducido para Alzheimer con una dieta enriquecida en manteca. En la figura 14 se muestra el tiempo empleado en la interacción con el objeto A y B, teniendo presente que en esta fase de familiarización los objetos son idénticos, encontrando que no hay diferencia significativa, entre el tiempo promedio utilizado por las ratas en la exploración de cada objeto. La media del tiempo en el objeto A fue de 3.48 ± 0.17 s y del objeto B fue de 3.38 ± 0.24 s.

En la figura 15, la media del índice de reconocimiento presentó diferencia significativa entre los grupos DEM y DEM + 4 mg/Kg de betanina en comparación con el control, sin embargo, el grupo DEM + 25 mg/Kg de betanina no presentó diferencia significativa en comparación con el control.

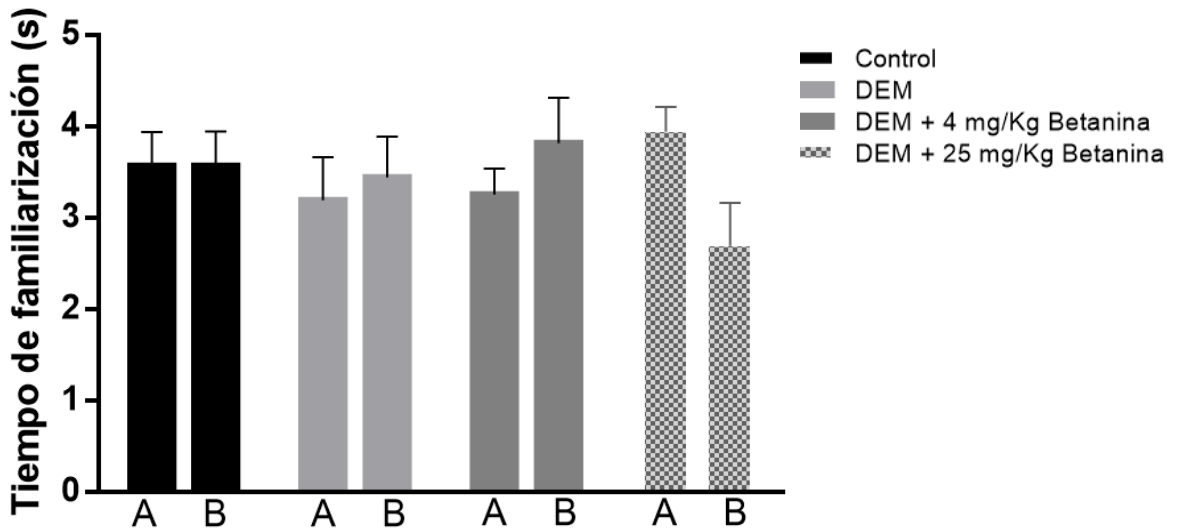


Figura 14. Tiempo de familiarización de la prueba de reconocimiento de objeto nuevo. No se observa diferencia significativa de los grupos en comparación con el control. Los valores corresponden a la media \pm error estándar, diferencia significativa (* $P \leq 0.05$). ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* de Bonferroni.

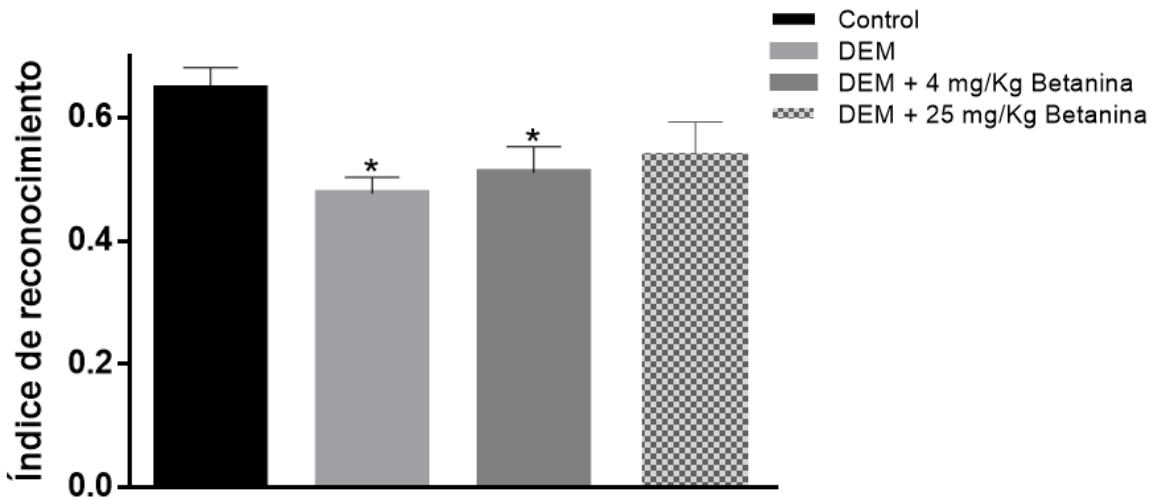


Figura 15.6. Índice de reconocimiento de la prueba de reconocimiento de objeto nuevo. Se presenta diferencia significativa de los grupos en comparación con el control. Los valores corresponden a la media \pm error estándar, diferencia significativa (* $P \leq 0.05$). ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* de Bonferroni.

7.4. Distribución del receptor a serotonina 5-HT_{5A} y 5-HT_{2C} en corteza cerebral por inmunofluorescencia

Con la finalidad de comprobar si el tiempo de bloqueo, así como la concentración de albúmina de suero bovino (BSA) y de poli-L-lisina (PLL), fue el adecuado para evitar falsos positivos en las muestras, se sometió una muestra a las mismas condiciones sin añadir ningún anticuerpo primario. En la figura 16 se observa que el tiempo de bloqueo a 2 h 15 min, 3% BSA y 0.1 PLL no presenta uniones inespecíficas del anticuerpo secundario FITC.

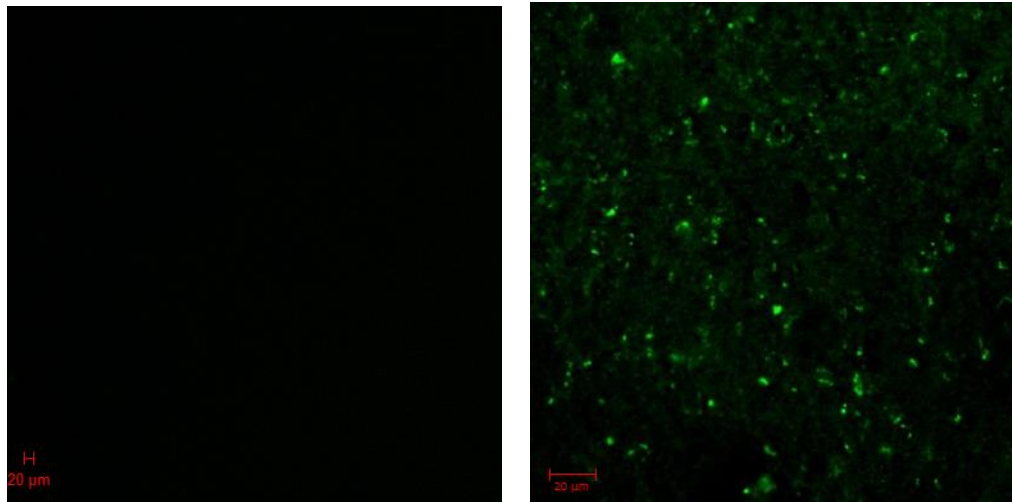


Figura 16. Determinación de unión inespecífica del anticuerpo FITC. Comparación de la laminilla blanco con la muestra control donde se observa que no hay presencia marca inespecífica a una concentración de 3% de Albúmina de suero bovino y 0.1 de poli-L-lisina.

La marca inmunofluorescente de la distribución de los receptores 5-HT_{2C} en corteza cerebral observa que disminuye en el grupo DEM en comparación con el grupo control (figura 17). La marca inmunofluorescente del grupo DEM + 4 mg/Kg de betanina muestra una similitud con el grupo DEM, por lo que también presenta una disminución en los receptores 5-HT_{2C} en comparación con el grupo control (figura 18). Sin embargo, el grupo DEM + 25 mg/kg de betanina no se observa un cambio en la marca inmunofluorescente en comparación con el control (figura 19).

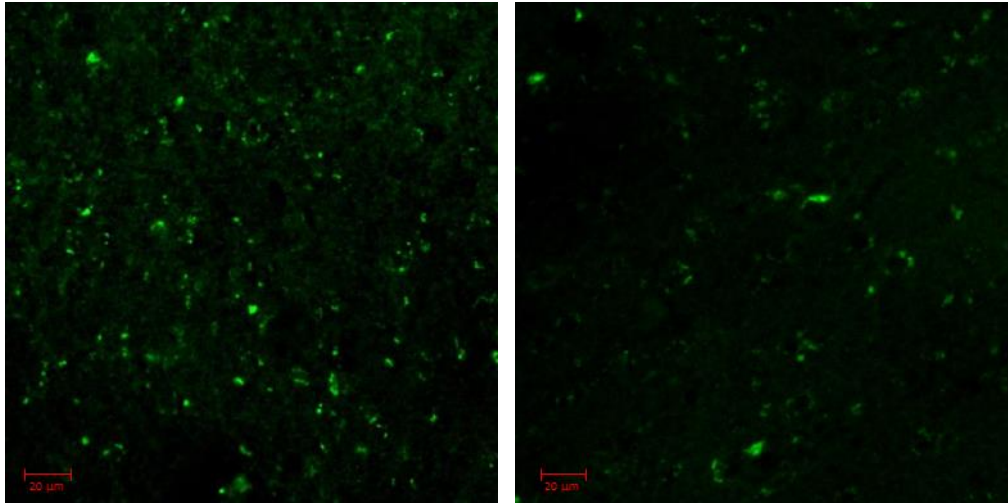


Figura 17. Distribución de los receptores 5-HT_{2C} en corteza cerebral. Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control (izquierda) y de la muestra DEM (derecha).

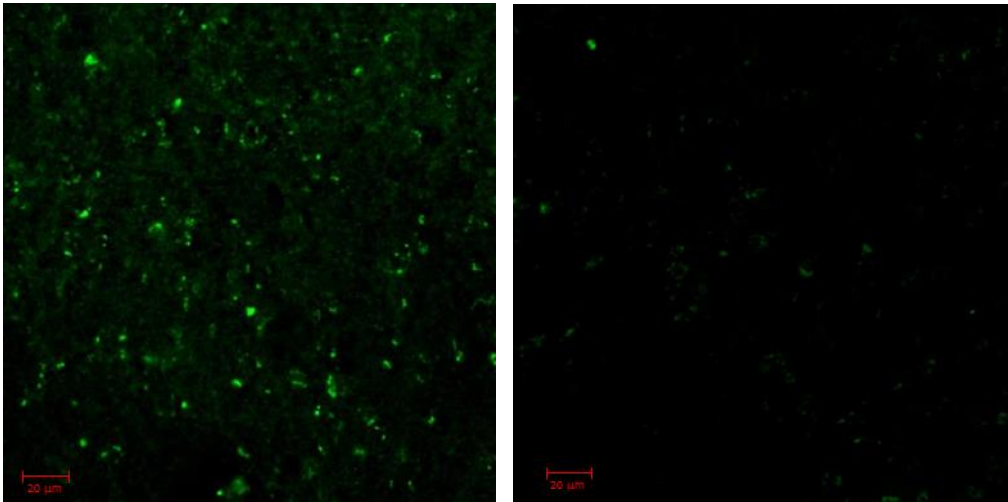


Figura 18. Distribución de los receptores 5-HT_{2C} en corteza cerebral. Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control (izquierda) y de la muestra DEM + 4 mg/Kg de betanina (derecha).

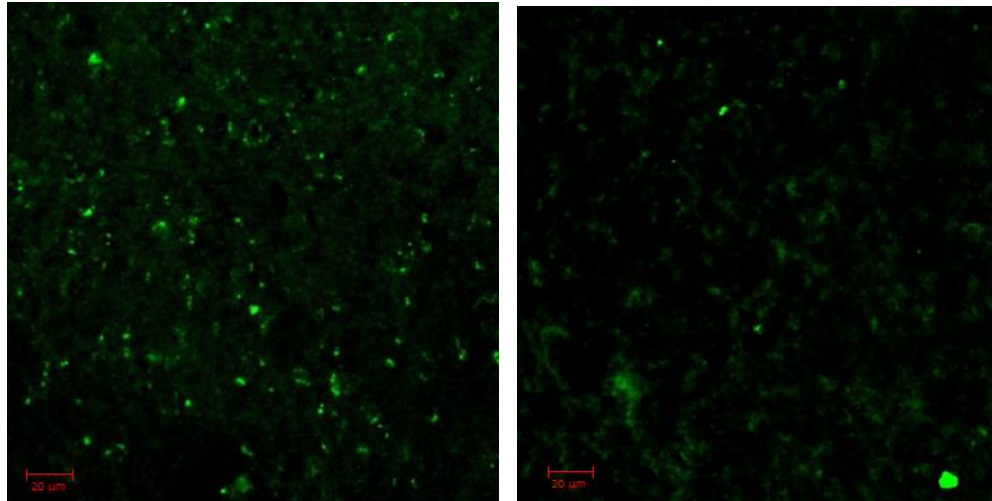


Figura 19. Distribución de los receptores 5-HT_{2C} en corteza cerebral. Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control (izquierda) y de la muestra DEM + 25 mg/Kg de betanina (derecha).

En corteza cerebral, la marca inmunofluorescente de la distribución del receptor 5-HT_{5A} se muestra una disminución del grupo DEM en comparación con el control (figura 20). De manera similar, la distribución del receptor 5-HT_{5A} en el grupo DEM + 4 mg/Kg y 25 mg/Kg de batanina disminuye en comparación con el control (figura 21 y 22).

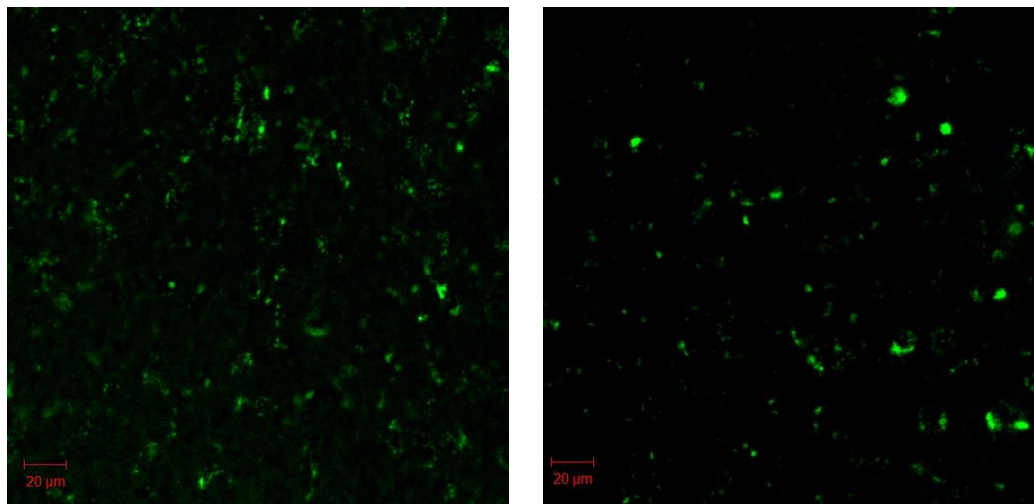


Figura 20. Distribución de los receptores 5-HT_{5A} en corteza cerebral. Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control (izquierda) y de la muestra DEM (derecha).

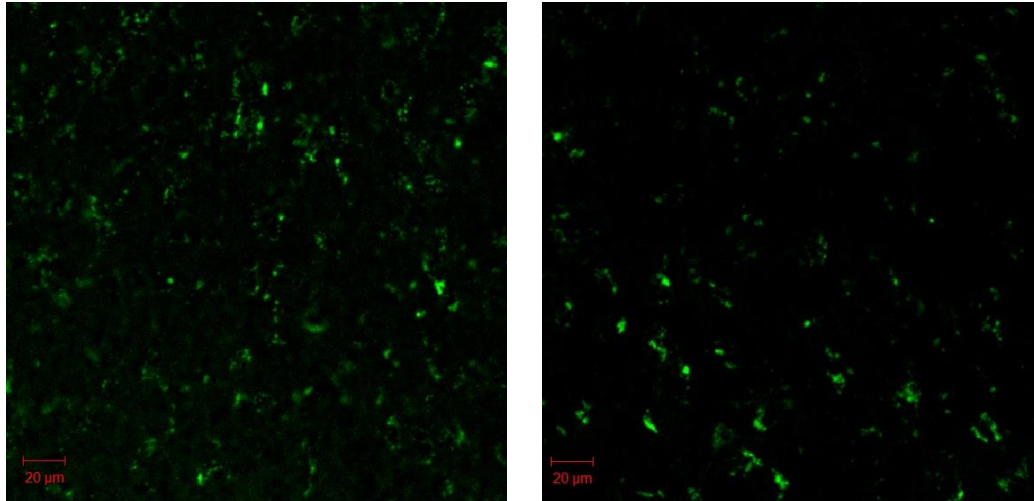


Figura 21. Distribución de los receptores 5-HT_{5A} en corteza cerebral. Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control (izquierda) y de la muestra DEM + 4 mg/Kg de betanina (derecha).

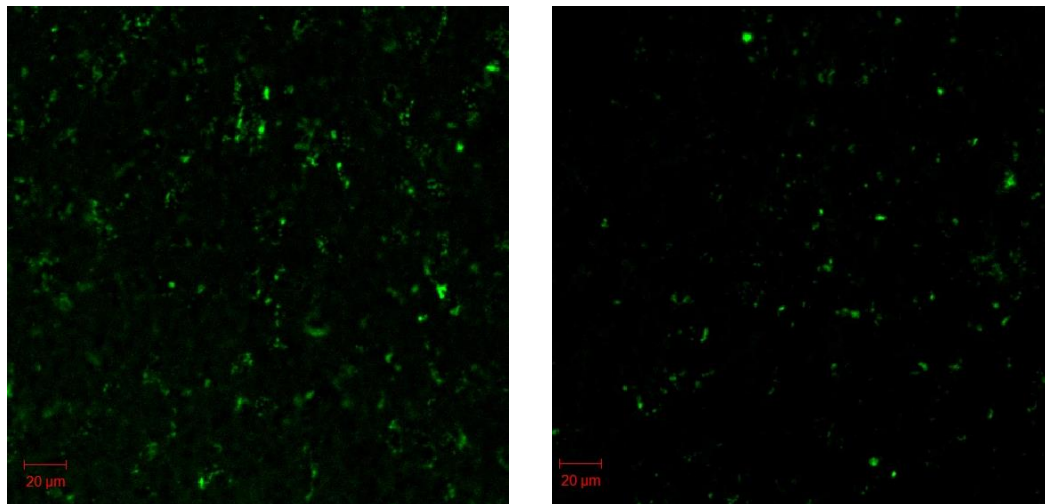


Figura 22. Distribución de los receptores 5-HT_{5A} en corteza cerebral. Comparación de la marca inmunofluorescente de la muestra control (izquierda) y de la muestra DEM + 25 mg/Kg de betanina (derecha).

8. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El aumento de peso inducido por una dieta alta en alimentos energéticos ricos en grasas saturadas y azúcares son un detonante hacia las enfermedades crónicas, entre las que sobresalen las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y la obesidad (OMS, 2003). Se ha visto que la relación entre obesidad y el desarrollo de la demencia es de un 60% comparado con individuos que no presenten obesidad, además que en mujeres el riesgo es mayor (Chatterjee *et al.*, 2016). Un factor desencadenante hacia el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA), y que está relacionado con una alimentación rica en alimentos energéticos, se encuentra la hipercolesterolemia (Boss *et al.*, 2017). Los niveles altos de triglicéridos también están asociados con el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Rasmussen, 2016).

El colesterol proveniente de la dieta es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo su metabolito secundario 27-hidroxicolesterol (27-OHC) es capaz de llegar al SNC causando efectos importantes en la modulación distintos genes y en la alteración de la memoria (Heverin *et al.*, 2015). En el estudio realizado por Brooks *et al* (2017) evaluaron en un modelo inducido de colesterol por dieta en conejos los efectos del metabolito 27-OCH en los receptores a estrógenos de tipo alfa ($ER\alpha$) y de tipo beta ($ER\beta$) demostrando que el aumento de 27-OHC en hipocampo provoca una disminución de la expresión de $ER\alpha$, del marcador sináptico PSD-95 y del aumento de $ER\beta$ el cual se cree que está relacionado con la disminución de la función mitocondrial en neuronas por lo que concluyeron que el 27-OHC es capaz de modular a los ER.

La función de la lipoproteína E (ApoE) en el sistema nervioso central (SNC) es la de transportar componentes lipídicos, los cuales contribuyen a la construcción de la vaina de mielina. Un aumento del contenido de colesterol llega a afectar las enzimas intramembranales, relacionadas con la formación de β -amiloide, $A\beta$ (De Oliveira *et al.* 2017). A nivel periférico, la apolipoproteína E (apoE) es la encargada del

transporte de triglicéridos. La presencia del alelo APOE ϵ 4 se encuentra relacionado en los dos tipos que se presenta la EA, de inicio temprano y de inicio tardío (Liu *et al.*, 2013), debido a que tiene una mayor afinidad con A β en comparación con ApoE2 o ApoE3. Además de que induce la agregación de los péptidos de A β , relacionados con un riesgo mayor de la EA (Dong *et al.*, 2012).

En las ratas hembras *Wistar* se presentó un aumento significativo del peso a partir del primer mes de ingesta con la dieta enriquecida en manteca (DEM) en comparación con el control, siendo el incremento del 29.4%, 28.6% y 33% de los grupos DEM, DEM + 4 mg/Kg de betanina y DEM + 25 mg/Kg de betanina, respectivamente. Los niveles de colesterol total en sangre no se vieron modificados, sin embargo, los niveles de triglicéridos se encontraron aumentados en los grupos DEM, DEM + 4 mg/Kg de betanina y DEM + 25 mg/Kg de betanina en comparación con el control. Los resultados del aumento de peso y el contenido elevado de triglicéridos para un modelo de rata para Alzheimer fueron consistentes con los resultados de Spagnuolo *et al.* (2015), donde reportan que con una dieta enriquecida con manteca presentaron un aumento de peso (16%) y de triglicéridos a las 24 semanas después de haber iniciado su tratamiento en un modelo de obesidad, para inducir daño a memoria a largo plazo, sin embargo, difieren en nuestros resultados con los niveles de colesterol debido a que no encontramos diferencia significativa a las 24 semanas, posiblemente se deba a que las ratas hembras presenten un metabolismo del colesterol más regulado que en comparación con los machos.

En el estudio realizado por Lee *et al.* (2008) demostraron que las hormonas sexuales están implicadas en el crecimiento corporal y en los niveles de colesterol plasmático en ratas Sprague-Dawley hembras y machos alimentadas con una dieta alta en colesterol, encontrando que los niveles de colesterol son dos veces más altos en las ratas hembras comparadas con los machos, por lo que proponen que los estrógenos juegan un papel importante en la secreción de hormonas que incrementan el metabolismo producido por el estrés. En nuestros resultados al no observar diferencia significativa en los niveles plasmáticos de colesterol total entre el grupo

control y los grupos alimentados con la dieta alta en colesterol posiblemente se deba a que estos grupos al presentar un mayor estrés oxidativo provocado por la dieta se esté aumentando el metabolismo del colesterol que esté llevando al aumento de los niveles hormonales.

La determinación de las capacidades de aprendizaje espacial en las ratas se midió a través del laberinto radial de 8 brazos y la prueba de reconocimiento de objeto nuevo lo que nos permitió validar el comportamiento en el modelo inducido. En la prueba del laberinto radial de 8 brazos no se observó ninguna alteración en el tiempo de reconocimiento del brazo correcto con la recompensa, por lo que se descarta un posible daño en memoria a largo plazo en el desarrollo del modelo inducido. Los modelos preclínicos en animales son de gran importancia en pruebas para evaluar los mecanismos hipotéticos de fármacos en la EA, debido a que desarrollan trastornos cognitivos muy similares a los pacientes que padecen la EA (Webster *et al.*, 2014).

La prueba de reconocimiento de objeto nuevo (NOR) permite evaluar los tiempos de exploración entre dos objetos, uno familiar y otro no conocido denominado objeto nuevo, por lo que la aplicación de esta prueba establece la evaluación de la memoria, el aprendizaje, la preferencia por la novedad y el procesamiento del reconocimiento entre las distintas áreas del cerebro relacionadas (Antunes y Biala, 2014). Nuestro estudio demostró que la betanina, a una concentración de 25 mg/Kg, protege del daño causado por una DEM en memoria a corto plazo, observado en NOR. Los resultados obtenidos son consistentes con Dan-Pan *et al.* (2017) en cuyo trabajo evaluaron el efecto cognitivo de los polifenoles del extracto de arándanos en un modelo 3x-transgénico de Alzheimer encontrando en NOR un aumento en el índice de reconocimiento a los 15 meses de edad, indicando que el extracto puede prevenir el deterioro de la memoria asociado con la EA.

Las hormonas sexuales femeninas han presentado un efecto importante, no sólo a nivel reproductivo, sino que también a nivel neuroprotector. En el cerebro, las

neuronas y los astrocitos pueden sintetizar estrógenos. Durante la etapa postmenopáusia los niveles de estrógenos disminuyen, este cambio se ha relacionado con la susceptibilidad a desarrollar la EA en comparación con hombres dentro de la misma edad. Las funciones neuronales en las que se ha relacionado el 17β -estradiol es el incremento de la neurogénesis en hipocampo por lo que mejoran las regiones de aprendizaje y memoria, reducción de β -amiloide a través de la vía no-amiloidogénica por la activación de MARK/ERK, disminución de los niveles de BACE1, la estimulación de la degradación de los acúmulos de β -amiloide, modulador mitocondrial, entre otras. En la corteza prefrontal, la disminución la síntesis de las hormonas sexuales también se encuentra relacionado con el avance de la EA (Li *et al.*, 2014).

Se ha observado que existen diferencias en las habilidades cognitivas y en el riesgo de padecer ciertas enfermedades neurológicas como la EA, entre hombres y mujeres. A través de imágenes mediante Resonancia Magnética se determinó ciertas estructuras cerebrales, entre hombres y mujeres, presentan diferencia en su volumen. En hombres es mayor el volumen de la amígdala y la corteza cerebral en comparación con mujeres, sin embargo, el volumen del hipocampo es mayor en mujeres que en hombres (Ruigrok *et al.*, 2014; Koolschijn y Crone, 2013). Se han propuesto que estas diferencias se deban a receptores específicos, en la amígdala se encuentra un número alto de receptores de andrógenos y en el hipocampo se encuentra un número elevado de receptores de estrógenos (Li y Singh, 2014).

El posible efecto protector que está ejerciendo la betanina, observado en la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, puede deberse al rol antioxidante que pudiera estar presentando en cerebro. Se ha propuesto que el estrés oxidativo es un factor importante en el desarrollo de la EA, debido a la generación de radicales libres que altera el sistema antioxidante endógeno y juega un papel importante en el daño neuronal. Un efecto protector mediado hacia una respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo, puede ser considerado un potencial componente para las enfermedades neurodegenerativas. El efecto antioxidante de la Betanina fue evaluado previamente

en el trabajo realizado por Han *et al.*, (2014) encontrando que la administración de betanina a una concentración de 25 mg/Kg dio como resultado un aumento significativamente en los principales sistemas antioxidantes endógenos, como es el glutatión (GSH), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), además de una disminución de malondialdehído (MDA) un compuesto formado por la peroxidación de los ácidos grasos.

En el estudio realizado por Song *et al.*, (2016) evaluaron el efecto protector de la silibinina, un compuesto con capacidad antioxidante, en un modelo inducido para daño cognitivo y demostraron que protegía de manera significativa los déficits de memoria, encontrando que en hipocampo reducía el estrés oxidativo al disminuir la concentración de MDA y aumentar GSH, además de que regula la autofagia, el cual es un proceso implicado en la alteración de la memoria inducida por A β llevando a una disminución de su eficacia resultando en muerte celular y neurodegeneración. Por lo que este estudio permite intuir que la betanina ejerce un efecto directo en los niveles de GSH y MDA en la corteza cerebral. El efecto que se ha observado en la regulación de la autofagia podría tener efecto con los receptores a serotonina, debido a la alteración de este proceso provocado por los péptidos de A β y dando como resultado el cambio observado en la memoria a corto plazo, debido a que la estructura de la betanina también posee grupos hidroxilo que son capaces de interaccionar con radicales libres, como en el caso de la silibinina, se lograría prevenir de esta manera que se sigan llevando a cabo reacciones de oxidación en la célula.

El almacenamiento de la información en el sistema nervioso depende del equilibrio de las redes neuronales. La inducción y el mantenimiento de los procesos que conducen a cambios es llevada a cabo a través de neurotransmisores. Dentro de la EA, la progresión del daño gradual en el aprendizaje y memoria se debe al deterioro en las áreas del cerebro relacionadas con estos procesos cognitivos. Las altas concentraciones de Ca²⁺ conducen a deterioros funcionales mitocondriales caracterizados por la activación de los poros de transición de permeabilidad en la

membrana mitocondrial interna, liberación del citocromo c y la formación simultánea de especies reactivas de oxígeno (Zhang *et al.*, 2016). Todos estos procesos de daño neuronal provocan alteraciones en distintos sistemas neuronales. Se ha estudiado que el aprendizaje y la potenciación de la memoria están relacionados tanto con el aumento de la actividad excitatoria en el sistema glutamatérgico como con la disminución de la actividad inhibitoria en el sistema GABAérgico (Benhamú *et al.*, 2014). Por lo que el papel que juegan los receptores a serotonina en la modulación de estos sistemas de neurotransmisores puede dirigir a una mejora cognitiva.

A través de técnicas como autorradiografía e inmunohistoquímica han determinado la expresión del receptor 5-HT_{2C} en distintas áreas del cerebro como en la corteza prefrontal, hipocampo, amígdala, ganglios basales, núcleo accumbens e hipotálamo (Werry *et al.*, 2008). La activación del receptor receptor 5-HT_{2C} desencadena la activación de la señalización de fosfolipasa C provocando el aumento de Ca²⁺. Se ha estudiado que los receptores 5-HT_{2A} postsinápticos pueden modular la consolidación de la memoria al participar en la plasticidad sináptica mediada por los receptores NMDA en corteza cerebral. Además, puede interactuar directamente con PSD-95 para regular el tráfico de receptores, entre otros efectos neuronales como es el aumento transitorio de espinogénesis dendríticas, fosforilación de PAK (factor neuronal de intercambio de nucleótidos Rac guanina), la expresión de BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) y en la actividad de la proteína cinasa activada por mitógeno de Erk (Zhang y Stackman, 2015).

Debido a la homología que presenta el receptor 5-HT_{2A} con el receptor 5-HT_{2C} y por el mecanismo de señalización, podemos esperar el mismo efecto de modulación en los procesos cognitivos, ofreciendo una nueva perspectiva para detener el deterioro en el aprendizaje y en la memoria asociada con trastornos neurodegenerativos como se ha estudiado con el receptor 5-HT_{2A}.

En el estudio realizado por Marney *et al.*, (2011) demostraron una reducción del 20-30% en la unión de los receptores 5-HT_{2A} en pacientes con deterioro cognitivo leve en comparación con personas sanas en áreas corticales. Por lo que este estudio es consistente con los resultados que obtuvimos con la marca inmunoreactiva del receptor 5-HT_{2C} en comparación con los grupos DEM y DEM + 4 mg/Kg de betanina, sugiriendo que el efecto de 25 mg/Kg de betanina presenta un efecto en la distribución de los receptores a serotonina. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para comprobar cómo es que la betanina lleva a cabo este proceso.

Los cambios en los receptores a serotonina 5-HT_{5A} pueden estar asociados a que la función del sistema serotoninérgicas en el SNC, representa una modulación importante en varios procesos, entre los que se encuentra el estado de ánimo, la ansiedad y la cognición. Para poder proponer un efecto de un compuesto que mejore la cognición y memoria en la EA, es necesario conocer los cambios que están ocurriendo con los receptores involucrados (Olivier, 2015).

El receptor 5HT_{5A} es un receptor transmembranal acoplado a proteína G_i, su distribución en el SNC está en la corteza cerebral, hipocampo, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo. Los resultados de este trabajo en los que se observa menor distribución de dichos receptores, puede asociarse a que se ha establecido que su expresión en la corteza cerebral y en hipocampo están relacionados con las funciones de cognición y memoria (Yamazaki *et al.*, 2015). Las vías de señalización moduladas por los receptores a serotonina, representan un punto importante para la modulación de la memoria, sin embargo, todavía se desconoce la implicación de cada subtipo en este proceso. Dentro de los subtipos G_i que se han estudiado, se encuentra el 5-HT_{1A}, el cual puede participar en la mejora las funciones de memoria (a corto y largo plazo) y la disminución de su actividad está relacionada con un deterioro en la memoria (Haider *et al.*, 2012).

En el estudio de García-Alloza *et al* (2004), se evaluó la expresión de los receptores 5-HT_(1B/1D) y 5-HT₆ en la corteza frontal y temporal, mediante un análisis *post mortem*

en pacientes con EA, encontrando una disminución significativa en la densidad del receptor 5-HT_(1B/1D) en comparación con individuos sanos. Las alteraciones del sistema serotoninérgico presentes en la EA corresponden, de acuerdo con los receptores homólogos al receptor 5-HT_{5A}, a una reducción en la distribución en distintas áreas del cerebro como es en la corteza cerebral e hipocampo, por lo que este trabajo es consistente con los resultados que obtuvimos en la disminución del receptor 5-HT_{5A} en los grupos administrados con DEM.

9. CONCLUSIONES

- El incremento de peso corporal de las ratas *Wistar* hembra fue significativo a partir del primer mes de la ingesta con la dieta enriquecida con manteca.
- La dieta enriquecida con manteca de cerdo y administrada a ratas *Wistar* hembra no incrementó los niveles de colesterol.
- La dieta enriquecida con manteca de cerdo y administrada a ratas *Wistar* incrementó significativamente los niveles de triglicéridos y no se observó dicha significancia en los grupos tratados con betanina.
- En el modelo implementado para Alzheimer en ratas *Wistar* hembras no se observaron cambios en memoria a largo plazo en el laberinto elevado de 8 brazos.
- La betanina, a una concentración de 25 mg/Kg, mejoró el deterioro cognitivo a corto plazo inducido por la dieta enriquecida con manteca en el modelo de rata observado en la prueba de reconocimiento de objeto nuevo.
- Se encontró una disminución en la distribución de los receptores 5-HT_{2C} en el grupo DEM y en el grupo DEM + 4 mg/Kg de betanina en comparación con el grupo control.
- Las ratas tratadas con DEM + 25 mg/Kg de betanina no presentaron cambios en la distribución del receptor 5-HT_{2C} comparado con el control.
- Se encontró una disminución en la distribución de los receptores 5-HT_{5A} en el grupo DEM y en los tratamientos de 4 mg/Kg y 25 mg/Kg de betanina en comparación con el grupo control.

10.REFERENCIAS

- Acosta-Cabronero, J., Peter, N. (2014). Difussion tensor imaging in Alzheimer's disease: insights into the limbic-diencephalic network and methodological considerations. *Front Aging Neurosci.* 6: 1-21.
- ALZ, Alzheimer's association. Página web. Consultado Agosto-2015. http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp
- Anderson, R., Quin, B., Canini, F., Poulet, L., Roussel, A. (2013). Cinnamon counteracts the negative effects of a high fat/ high fructose diet on behavior, brain insulin signaling and Alzheimer associated changes. *PLoS one.* 8: e83243.
- Antunes, M., Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and this modifications. *Cogn Process.* 13: 93-110.
- Asih, P., Chatterjee, P. Verdile, G., Gupta, V., Trengove, R., Martins, R. (2014). Clearing the amyloid in Alzheimer's: progress towards earlier diagnosis and effective treatments – an update for clinicians. *Neurodegener Dis Manag.* 4: 363-378.
- Badshah, H., Hyum T., Ok, M. (2015). Protective effects of Anthocyanins against Amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Neurochem Int.* 80: 51-59.
- Belyaev, N., Kellett, K., Beckett, C., Makova, N., Revett, T., Nalivaeva, N., Hooper, N., Turner, A. (2010). The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a β -Secretase-dependent Pathway. *J. Biol Chem.* 285: 41443–41454.
- Benhamú, B., Martín-Fontecha, M., Vázquez-Villa, H., Pardo, L., López-Rodríguez, ML. (2014). Serotonin 5-HT6 receptor antagonists for the treatment of cognitive deficiency in Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 17: 7160-7181.
- Bertram, L. (2007). Alzheimer's disease, advances in Genetics Molecular and Cellular Biology. First edition. Springer Science, USA: 1.
- Bos, I., Vos, S.J., Frölich, L., Kornhuber, J., Wiltfan, J., Maier, W., Peters, O., Rüther, E., Engelborghs, S., Niemantsverdriet, E., De Roeck, EE., Tsolaki, M., *et al.*

- (2017). The frequency and influence of dementia risk factors in prodromal Alzheimer's disease. 56: 33-40.
- Brooks, S., Dykes, A. Schreurs, B. (2017). A High-Cholesterol Diet Increases 27-Hydroxycholesterol and Modifies Estrogen Receptor Expression and Neurodegeneration in Rabbit Hippocampus. *J. Alzheimers Dis.* 56: 185-196.
- Chatterjee, S., Peters SA., Woodward, M., Mejia Arango, S., Batty, GD., Beckett, N., Beiser, A., Borenstein, AR., Crane, PK., Haan, M., Hassing, LB., Hayden, KM., *et al.* (2016). Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia. *Diabetes Care.* 39: 300-309.
- Claeyssen, S., Bockaert, J., Giannoni, P. (2015). Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease?. *ACS Chem Neurosci.* 7: 940-943.
- Conceição, L., Pessoa N., Lima, K., Ribeiro, R., França, G., Nunes, E., Mukhamedyarov, M., Lvovich, A., Rizvanov, A., Pavlovich, A., Vieira, L., Monteiro, M., Yalvaç, M., Teixeira, A., Camargo, M. Janka, Z., Romano-Silva, M., Palotás, A., Reis, H. (2012). Disease-specific expression of the serotonin-receptor 5-HT_{2C} in natural killer cells in Alzheimer's dementia. *J Neuroimmunol.* 251: 73-79.
- Cunningham, E., Passmore, A. (2013). Drug development in dementia. *Maturitas.* 76: 260-266.
- Dal-Pan, A., Dudonné, S, Bourassa, P., Bourdoulous, M., Tremblay, C., Desjardins, Y., Calon F. (2017). Cognitive-Enhancing Effects of a Polyphenols-Rich Extract from Fruits without Changes in Neuropathology in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 55: 115-135.
- De Oliveira, FF., Chen, ES., Smith, MC., Bertolucci, PH. (2017). Longitudinal lipid profile variations and clinical change in Alzheimer's disease dementia. *Neurosci Lett.* 646:36-42.
- Di Giovanni, G., De Deurwaerdèrec, P. (2016). New therapeutic opportunities for 5-HT_{2C} receptors ligands in neuropsychiatric disorders. *Pharmacology & Therapeutics.* 157: 125-162.

- Dong, S., Duan, Y., Hu, Y., Zhao, Z. (2012). Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl Neurodegener.* 1: 18.
- Esatbeyoglu, T., Wagner, AE., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., Rimbach, G. Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food Chem Toxicol.* 73: 119-26.
- Esatbeyoglu, T., Wagner, AE., Schini-Kerth, VB., Rimbach, G. (2015). Betanin -A food colorant with biological activity. *Mol Nutr Food Res.* 59: 36-47.
- Flórez, J. (2008). *Farmacología humana*. Cuarta edición. Editorial Masson. México: 335.
- García, R. (2011). Factores de riesgo y prevención de la enfermedad de Alzheimer. Primera edición. Editorial Glosa, España: 17, 23.
- Garcia-Alloza, M., Hirst, WD., Chen, CP., Lasheras, B., Francis, PT., Ramírez, MJ. (2004). Differential involvement of 5-HT(1B/1D) and 5-HT6 receptors in cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 29: 410-416.
- Gentier, R., Leeweun, F. (2015). Misframed ubiquitin and impaired protein quality control: an early event in Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 8: 47.
- Goedert, M., Spillantini, M. (2006). A century of Alzheimer disease. *Science.* 314: 777-781.
- Goedert, M. (2015). Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science.* 349: 1255555.
- Haider, S., Khaliq, S., Tabassum, S., Haleem, DJ. (2012). Role of somatodendritic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors on learning and memory functions in rats. *Neurochem Res.* 37: 2161-2166.
- Han, J., Zhang, Z., Yang, S., Wang, J., Yang, X., Tan, D. (2014). Betanin attenuates paraquat-induced liver toxicity through a mitochondrial pathway. *Food Chem Toxicol.* 70: 100-106.
- Hauser, P., Narayanaswami, V., Ryan, R. (2011). Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res.* 50: 62-74.

- Heverin, M., Maioli, S., Pham, T., Mateos, L., Camporesi, E., Ali, Z., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., Björkhem, I. (2015). 27-Hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. *Behav Brain Res.* 278: 356-359.
- Hoyer, D., Hannon, J., Martin, G. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 71: 533-554.
- Hyman, B., Phelps, C., Beach, T., Bigio, E., Cairns, N., Carrillo, M., Dickson, D., Duyckaerts C., Frosch, M., Masliah, E., Mirra, S., Nelson, P., Schneider, J., Thal, D., Thies, B., Trojanowski, J., Vinters, H., Montine, T. (2012). National Institute on Aging–Alzheimer’s Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement.* 8: 1-13.
- Jensen, N., Cremers, T., Sotty, F. Therapeutical potential of 5-HT_{2C} receptors ligands. *Scientific World Journal.* 14: 1870-1985.
- Kim, H., Choi H., Yong, J., Kim, Y., Mosaddik, A., Kim, S. (2011). Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. *J Food Sci.* 76: C38-C45.
- Koolschijn, PC., Crone, EA. (2013). Sex differences and structural brain maturation from childhood to early adulthood. *Dev Cogn Neurosci.* 5: 106-18.
- Krstic, D., Knuesel, I. (2013). Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 9: 25 – 34.
- Lau, L., Brodney M. (2008). Alzheimer disease. First edition. Springer-Verlag. USA: 4, 5.
- Lee, CE., Kang, JS., Kim, KI. (2008). Effects of gender, gonadectomy and sex hormones on growth and plasma cholesterol level in rats. *Ann Nutr Metab.* 53: 1-5.
- Leiser, SC., Li, Y., Pehrson, AL., Dale, E., Smagin, G., Sanchez, C. (2015). Serotonergic regulation of prefrontal cortical circuitries involved in cognitive processing: a review of individual 5-HT receptor mechanisms and concerted effects of 5-HT receptors exemplified by the multimodal antidepressant vortioxetine. *ACS Chem Neurosci.* 6: 970-86.

- Li, R., Cui, J., Shen, Y. (2014). Brain Sex Matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol.* 389: 13-19.
- Li, R, Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 35: 385-403.
- Liu, K., Lefker, B., Dombroski, M., Chiang, P., Cornelius, P., Patterson, T., Zeng, Y., Santucci, S., Tomlinson, E., Gibbons, C., Marala, R., Brown, J., Kong, J., Lee, E., Werner, W., Wenzel, Z., Giragossian, C., Chen, H., Coffey, S. (2010). Orally active and brain permeable prolineamides as highly selective 5-HT_{2C} agonist for the treatment of obesity. *Bioorg Med Lett.* 7: 2365-2369.
- Liu, CC., Liu, CC., Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 9:106-18.
- López-Esparza, S. (2014). Modificaciones en la expresión de receptores a serotonina 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} en el hipocampo de ratas con obesidad inducida por dieta. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UAQ. 45-55.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica.* Decimoctava edición. Editorial Medica-Panamericana. China: 322.
- Mao, X., Liao, Z., Guo, L., Xu, X., Wu, B., Zhao, X., Bi, K., Jia, Y. (2015). Schisandrin C ameliorates learning and memory deficits by A β 1-42 -induced oxidative stress and neurotoxicity in mice. *Phytother Res.* Doi: 10.1002/ptr.5390
- Marnier, L., Knudsen, GM., Madsen, K., Holm, S., Baaré, W., Hasselbalch, SG. (2011). The reduction of baseline serotonin 2A receptors in mild cognitive impairment is stable at two-year follow-up. *J Alzheimers Dis.* 23: 453-459.
- McCorvy, J., Roth, B. (2015). Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 150: 129-142.
- Mecawi, A., Fonseca, F., De Araujo, I., Reis, L. (2014). *Neurobiology of body fluid homeostasis.* First edition. CRC Press/Taylor & Francis. United Kingdom: Chapter 11.
- Mizukami, K., Ishikawa, M., Akatsu, H., Abrahamson, E., Ikonovic, M., Asada, T. (2011). An immunohistochemical study of the serotonin 1A receptor in the

- hippocampus of subjects with Alzheimer's disease. *Neuropathology*. 31: 503-509.
- Noristani, N., Meadows, R., Olabarria, M., Verkhatsky, A., Rodríguez, J. (2011). Increased hippocampal CA1 density of serotonergic terminals in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: an ultrastructural study. *Cell Death Dis*. 2: e210.
- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *Eur J Pharmacol*. 753: 2-18.
- Ortiz, GG., Pacheco Moisés, FP., Mireles-Ramírez, M., Flores-Alvarado, LJ., González-Usigli, H., Sánchez-González, VJ., Sánchez-López, AL., Sánchez-Romero, L., Díaz-Barba, E., Santoscoy-Gutiérrez, JF., Rivero-Moragrega, P. (2017). Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 108: 1-31.
- OMS, Organización mundial de la Salud. Página web. Consultado Octubre-2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
- OMS, Organización mundial de la Salud. Página web. Consultado Agosto-2017. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr20/es/>
- Patel, T., Zhou F. (2005). Ontogeny of 5-HT_{1A} receptor expression in the developing hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*.1571: 42-57.
- Peña-Casanova, J., Sánchez-Benavides, G., De Sola, S., Monero-Borrás, R., Casals-Coll, M. (2012). Neuropsychology of Alzheimer's disease. 8: 686-693.
- Rajasekhar, K., Chakrabarti, M., Govindaraju, T. (2015). Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Chem Commun (Camb)*. 51:13434-50.
- Raote, I., Battacharya, A., Panicker, M. (2007). Serotonin Receptors in Neurobiology. First edition. Amitabha Chattopadhyay Editor. India: Champer 6.
- Rasmussen, KL. (2016). Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype and risk of dementia and ischemic heart disease: A review. *Atherosclerosis*. 255:145-155.
- Ruigrok, AN., Salimi-Khorshidi, G., Lai, MC., Baron-Cohen, S., Lombardo, MV., Tait, RJ., Suckling, J. (2014). A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neurosci Biobehav Rev*. 39: 34-50.

- Serý, O., Povová, J, Míšek, I., Pešák, L., Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.* DOI: 1: 1-9.
- Soares, H., Sparks, L. (2008). *Beyond Cholesterol: Statin Benefits in Alzheimer's Disease.* Second edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2: 52.
- Spagnuolo, MS., Mollica, MP., Maresca, B., Cavaliere, G., Cefaliello, C., Trinchese, G., Scudiero, R., Crispino, M., Cigliano, L. (2015). High Fat Diet and Inflammation - Modulation of Haptoglobin Level in Rat Brain. *Front Cell Neurosci.* 9: 479.
- Subash, S. Essa, M., Braindy, N., Awlad-Thani, K., Vaishnav, R., Al-Adawi, S. Al-Asmi, A., Guillemin, G. (2015). Diet rich in date palm fruits improves memory, learning and reduces beta amyloid in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Ayurveda Integra Med.* 6: 111-120.
- Suh, D., Lee, S., Heo, D., Kim, Y., Cho, S., Lee, S., Lee, C. Metabolite profiling of red and white pitayas (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) for comparing betalain biosynthesis and antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 34: 8764-8771.
- Taira, J., Tsuchida, E., Kato, M., Uehara, M., Ogi, T. (2015). Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chemistry.* 166: 531-536.
- Tarasoff-Conway, J., Carare, R., Osorio, R., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B., Frangione, B., Blennow, E., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., De León, M. (2015). Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11: 457-70.
- Thal, D., Walter, J., Saido, T., Fändrich, M. (2015). Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 129: 167-182.
- Thinakaran G., Koo E. (2007). *Alzheimer's disease: advances in genetics molecular and cellular biology.* First edition. Springer Editorial. USA: 19-20.

- Thummayot, S. Tocharus, C., Pinkaew, D., Viwatpinyo, K. Sringarm, K. Tocharus, J. (2014). Neuroprotective effect of purple rice extract and its constituent against amyloid beta-induced neuronal cell death in SK-N-SH cells. *Neurotoxicology*. 45: 149-158.
- Uchihara, T. (2014). Pretangles and neurofibrillary changes: Similarities and differences between AD and CBD based on molecular and morphological evolution. *Neuropathology*. 34: 571–577.
- Ullrich, C., Pirchl, M., Humpel, C. (2010). Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci*. 45: 408-417.
- Webster, SJ., Bachstetter, AD., Nelson, PT., Schmitt, FA., Van Eldik, LJ. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*. 5: 88.
- Werry, TD., Loiacono, R., Sexton, PM., Christopoulos, A. (2008). RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. *Pharmacol Ther*. 119: 7-23.
- Wolf, A., Caselli, R., Reiman, E., Valla, J. (2013). APOE & Neuroenergetics: an emerging paradigm in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging*. 34: 1007–1017.
- Xu, Y, Yan, J., Zhou, P., Li, P., Gao, H., Xia, Y., Wang, Q. (2012). Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 97: 1-13.
- Yamazaki, M., Okabe, M., Yamamoto, N., Yarimizu, J., Harada, K. (2015). Novel 5-HT_{5A} receptor ameliorate scopolamine-induced working memory deficit in mice and reference memory impairment in aged rats. *J Pharmacol Sciences*. 127: 362-369.
- Young, T., Manthorp, C., Howells, D. (2010). Primera edición. Editorial Aresta. España: 17.
- Zhang, Y., Li, P., Feng, J., Wu, M. (2016). Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol Sci*. 7: 1039-1047.
- Zhang, G., Stackman, RW. (2015). The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. *Front Pharmacol*. 6: 225.