



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CAMBIOS INDUCIDOS POR TEOBROMINA SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1 Y  
D2 EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATA DE UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER  
ESPORÁDICO”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**ARELY JANET FLORES MONZÓN**

DIRIGIDA POR

**M. en C. JESÚS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2018.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



CAMBIOS INDUCIDOS POR TEOBROMINA SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1  
Y D2 EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATA DE UN  
MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER ESPORÁDICO.

**por**

Arely Janet Flores Monzón

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQLIN-237724



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CAMBIOS INDUCIDOS POR TEOBROMINA  
SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES  
DOPAMINÉRGICOS D1 Y D2 EN CORTEZA PREFRONTAL  
DE RATA DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ARELY JANET FLORES MONZÓN

DIRIGIDA POR

**M. en C. JESÚS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA**

SINODALES

M. en C. JESÚS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA  
DIRECTOR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER  
SINODAL

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA  
SINODAL

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE  
SINODAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Página</b>
Contenido	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Demencia	1
1.2 Enfermedad de Alzheimer	3
1.2.1 Epidemiología	3
1.2.2 Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer	4
1.2.3 Factores de Riesgo	5
1.2.3.1 Factores genéticos	5
1.2.2.2 Otros factores	5
1.3 Signos y síntomas de la Enfermedad	7
1.3.1 Síntomas Psiquiátricos y Conductuales (neuropsiquiátricos)	8
1.3.2 Síntomas de Ámbito Funcional	10
1.3.3 Síntomas Cognitivos	10
1.4 Factores Etiológicos	11
1.4.1 Acumulación del péptido $\beta$ -amiloide en placas seniles	12
1.4.2 Hiperfosforilación de Tau	13
1.5 Alteraciones en Sistemas de Neurotransmisores en Alzheimer	14
1.5.1 Sistema Neurotransmisor de Acetilcolina	14
1.5.2 Sistema Neurotransmisor de Serotonina	15
1.5.3 Sistema Neurotransmisor de Ácido $\gamma$ -aminoburtírico (GABA)	16

1. 5. 4 Sistema Neurotransmisor de Glutamato	16
1. 5. 5 Sistema Neurotransmisor de Dopamina en enfermedad de Alzheimer	18
1. 6 Diagnóstico de la Enfermedad	19
1. 7 Tratamientos	20
1. 7. 1 Tratamiento con productos naturales	21
1. 7. 2 Teobromina	22
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVOS	25
3. 1 General	25
3. 2 Específicos	25
4. METODOLOGÍA	26
4.1 Materiales	26
4. 1. 1 Reactivos	26
4. 1. 2 Materiales	26
4. 1. 3. Equipos	27
4.2 Métodos	27
4. 2. 1 Animales y tratamiento	27
4. 2. 2 Pruebas Conductuales de Memoria	28
4. 2. 1 Test de memoria espacial en laberinto de 8 brazos	28
4. 2. 3 Determinación cuantitativa los de niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.	30
4. 2. 4 Disección del Tejido	30
4. 2. 5 Fijación de Tejidos	32
4. 2. 6 Crioprotección de Tejidos	32
4. 2. 7 Cortes de Tejido	32

4. 2. 8 Inmunofluorescencia	32
4. 2. 9 Análisis estadístico	33
4. 3 Diseño Experimental	35
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	49
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
9. ANEXOS	57

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Criterios del Diagnóstico de Demencia	2
2	Polimorfismos Genéticos Asociados a la Enfermedad de Alzheimer y su implicación funcional.	6
3	Signos de Alarma de la Enfermedad de Alzheimer	8
4	Grupos de Estudio	27
5	Condiciones Experimentales	34
6	Diseño Experimental	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Etiología del Alzheimer.	12
2	Procesamiento proteolítico de APP.	13
3	Implicación de A $\beta$ y los receptores metabotrópicos de Glutamato.	17
4	Estructura Química de las Metilxantinas.	21
5	Similitud estructural de las metilxantinas con la Adenosina.	22
6	Laberinto de brazos radiales.	29
7	Representación esquemática de la disección. Incisión lateral a través del tegumento y la pared abdominal.	30
8	Representación esquemática de la Perfusión de tejido.	31
9	Representación esquemática de la extracción del encéfalo de rata.	31
10	Control de peso a través del tiempo.	36
11	Niveles plasmáticos de colesterol.	37
12	Niveles plasmáticos de triglicéridos	38
13	Test de memoria espacial en laberinto elevado de 8 brazos	39
14	Expresión de receptores dopaminérgicos D1 en tejido de la CPF	41
15	Expresión de receptores dopaminérgicos D2 en tejido de la CPF.	42

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las de las demencias más comunes en la actualidad, y en la mayoría de los casos están involucrados la herencia genética así como el estilo de vida. La enfermedad se caracteriza por la acumulación extracelular de péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), la hiperfosforilación de la proteína Tau, así como cambios en la concentración de neurotransmisores como la acetilcolina. Varios estudios epidemiológicos han permitido determinar factores de riesgo asociados a la enfermedad como lo son la edad, carga genética (apolipoproteína E), factores metabólicos y obesidad. La prevención de la enfermedad se orienta a modificar el estilo de vida de la persona; o por tratamientos farmacológicos que van dirigidos a tratar los síntomas como los inhibidores de la acetilcolinesterasa y antagonistas NMDA. De acuerdo a lo publicado hasta el momento, se sabe que el consumo de metilxantinas como cafeína y teobromina principalmente, se asocian a la prevención o ralentización de la neurodegeneración en la EA, por mecanismos múltiples; es por eso que en el objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto que tiene la teobromina administrada en dosis de 30 mg/L, sobre la expresión de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 de un modelo murino experimental de la EA esporádica, inducido por una dieta alta en grasas. Se comprobó que la ingesta sostenida de una dieta alta en grasas, a base de manteca de cerdo, permite observar el fenotipo de la EA esporádica al provocar un aumento en la concentración de triglicéridos plasmáticos, pero no de colesterol, y una disminución persistente de las capacidades cognitivas a lo largo del estudio; efecto inhibido por la administración de teobromina [30 mg/L], que ejerce una actividad de neuroprotección a través de un mecanismo que implica la activación de heterocomplejos de receptores de Adenosina y Dopamina (RA-RDA).

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Demencia

La manera más sencilla de definir la demencia es como un síndrome clínico de múltiple etiología, adquirido, que se caracteriza por el deterioro permanente de la memoria, la disminución de la capacidad intelectual en comparación con el nivel previo de función (Peña-Casanova, 1999; Ángeles-Abanto y Escobar-Fernández, 2015). Frecuentemente, esta disminución va acompañada de cambios psicológicos y alteraciones del comportamiento, sin afectación de la conciencia y depresión, que promueve la alteración de las capacidades sociales de los afectados. Por lo general esta enfermedad es de tipo crónico y progresivo (Ángeles-Abanto y Escobar-Fernández, 2015).

La demencia es considerada un síndrome debido a que no se hace referencia a una enfermedad en concreto, sino a un conjunto de síntomas. El concepto indica una creciente pérdida de las capacidades y la afección de la capacidad de funcionamiento laboral y/o social del sujeto (Ángeles-Abanto y Escobar-Fernández, 2015). En términos técnicos los médicos definen la demencia mediante una serie de características o rasgos específicos, resumidos en el Cuadro 1.

Tras detectar la presencia de estos síntomas se debe buscar la causa de dicho deterioro, con el fin de abordar un tratamiento y establecer un pronóstico específico para cada caso. Tal como lo hicieron Bouchard y Rossor en 1996, quienes clasificaron las causas principales de un deterioro progresivo de las capacidades mentales, en cuatro grandes grupos:

1. Enfermedades Generales: (Hipertensión, diabetes, anemias, etc.).
2. Enfermedades Psiquiátricas o mentales.
3. Enfermedades Neurológicas con demencia secundaria (tumores cerebrales, trastornos de circulación, por mencionar solo algunas).
4. Demencias degenerativas cerebrales primarias: Alzheimer, ejemplo más común.

Cuadro 1. Criterios del Diagnóstico de Demencia (Tomado de Bouchard y Rossor, 1996).

<p>A. Desarrollo de múltiples trastornos cognitivos manifestados por:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Alteración de la memoria: incapacidad para fijar nuevos recuerdos y/o para evocar recuerdos antiguos.</li><li>2. Alteración de uno o más de los siguientes aspectos:<ul style="list-style-type: none"><li>• Afasia: alteración del lenguaje (comprender, expresarse).</li><li>• Apraxia: alteración de la gestualidad (manipular objetos).</li><li>• Agnosia: fallos de reconocimiento de objetos.</li><li>• Alteración de la función ejecutiva: Planificar, secuenciar, abstraer.</li></ul></li></ol>
<p>B. Alteración significativa del funcionamiento familiar, social o laboral.</p>
<p>C. Inicio gradual y disminución cognitiva continuada respecto al nivel previo de funcionamiento.</p>

Sin embargo, en muchos centros especializados se realiza una clasificación de las demencias en relación con las zonas cerebrales predominantemente afectadas:

- Demencias corticales: la zona afectada es la capa más externa del cerebro, la corteza cerebral, son consecuencia de cambios degenerativos y se hacen notorios por síntomas como amnesia, afasia, apraxias y agnosias (García-Ardura, 2016). En esta clasificación, la EA es protagonista; y en ésta, se puede observar claramente la atrofia sobre todo en la región del hipocampo, áreas de asociación de la corteza y ventrículos muy expandidos. No afectan las áreas visuales de la corteza, somato-sensorial y auditivas (Wendosell, 2014).
- Demencias subcorticales: las partes afectadas son las más profundas del cerebro, particularmente los llamados “núcleos grises de la base”; por ejemplo, la enfermedad de Parkinson o en los cuerpos de Lewy.
- Demencias mixtas: Afectan ambas zonas, cortical y subcortical.

Uno de los factores de riesgo principales para las formas comunes de demencia es el envejecimiento; su prevalencia afecta al 8% de las personas de al menos 65 años llegando a alcanzar hasta un 20% en mayores de 80 años. Hasta el 75 % de las personas de la tercera edad que residen en alguna institución sufre alguna forma de deterioro cognitivo significativamente clínica (Ángeles-Abanto y Escobar-Fernández, 2015). Existen más de setenta causas y enfermedades diversas que pueden hacer que una persona presente demencia (Peña-Casanova, 1999). Como es de esperarse sólo algunas de las causas son atendibles, lamentablemente son también las que se presentan con menos frecuencia. Otras enfermedades pueden ser tratadas con el fin de frenar su progreso y atenuar los síntomas.

Actualmente la principal causa de demencia a nivel mundial es la EA ya que representa el 50-56% de todos los casos (Moreno-Cervantes y col., 2015); al 2013 se reporta una incidencia del 8% presente en personas mayores de 65 años y 20% en mayores de 80 años (Montes y col., 2013).

## 1. 2 Enfermedad de Alzheimer

La EA es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central que se caracteriza por la muerte neuronal progresiva e irreversible en ciertas zonas del cerebro (Martínez-Pinilla y col., 2015); en donde las zonas más afectadas son la corteza cerebral y el hipocampo. Las neuronas dejan de funcionar y pierden la conexión con otras, manifestándose esto en la pérdida de la función cerebral que puede afectar en forma adversa a la memoria, el pensamiento, el lenguaje, la orientación al entorno físico, el entendimiento, el juicio, la toma de decisiones y el comportamiento, así como la capacidad de llevar a cabo las tareas más simples de la vida diaria; en algunos casos puede ser incluso causa de muerte (Velez-Valle y Luna-Cortés, 2015).

### 1. 2. 1 Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud la EA es una de las causas más comunes de demencia; representa 60% a 70% de los 47.5 millones de casos de demencia en

el mundo y también es la demencia más común en América Latina (OMS, 2016; López-Locanto, 2015). Se estima, además, que los casos de personas con EA en todo el mundo en el año 2050 serán de alrededor de 80 millones y aproximadamente el 20% de estas personas estarán ubicados en países del Centro y Sur América (Villarreal y col., 2014; Allegri, 2016). Por otra parte, en 2016 el Instituto Nacional de Geriátrica informa que de los 800 mil casos de demencia en México, dos tercios eran por EA, afectando aproximadamente 28 de cada mil adultos mayores de 60 años (Gutiérrez-Robledo, 2016). En cuanto a la distribución por sexos, las mujeres tienden a presentar mayor incidencia a edades más avanzadas (López-Locanto, 2015). Aproximadamente el 25% de los casos con la enfermedad guarda una relación genética, de éstos el 95% es de inicio tardío, es decir, se presenta a edades mayores de 65 años, y el 5% restante de inicio temprano, en personas menores de 65 años (Bird y col., 2015).

#### 1. 2. 2 Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer

Se pueden establecer dos categorías generales de la enfermedad: Alzheimer esporádico o de aparición tardía y, Alzheimer familiar o de inicio temprano. El primero se presenta a edades mayores de 65 años y el segundo en personas de menor edad. La EA de tipo esporádica está asociada a factores genéticos y ambientales, grupo al que pertenecen cerca del 85 al 95% de los casos (Mendiola-Précoma y col., 2016); por otro lado, la EA familiar corresponde para 5 al 15% de los casos y se debe a mutaciones en los genes: del cromosoma 21 codificante de la proteína precursora de amiloide; del cromosoma 14 que codifica para presenilina 1, o a mutaciones en el cromosoma 1, correspondiente a la presenilina 2. El factor de susceptibilidad es el alelo  $\epsilon 4$  la del gen de la apolipoproteína E. En los dos casos, la enfermedad está relacionada con la acumulación de la proteína  $\beta$ -amiloide, la cual da lugar a alteraciones que conducen a la muerte neuronal y a agregados de proteína tau.

### 1. 2. 3 Factores De Riesgo

Como es de esperarse hay ciertos factores predisponentes que aumentan la probabilidad de padecer la EA; entre éstos, la edad es uno de los principales factores, pues la enfermedad se presenta con mayor incidencia en edades mayores a 65 años.

#### 1. 2. 3. 1 Factores genéticos

La EA es una enfermedad compleja en la que existe una relación entre factores genéticos y ambientales, los cuales al interactuar dan lugar al fenotipo final. Hay tres genes asociados: el gen que codifica para la proteína precursora amiloide (APP) y los que lo hacen para presenilinas (PSEN1 y PSEN2). La producción del péptido amiloide depende del estado del gen de la APP, del gen BACE (productor de la  $\beta$ -secretasa) y de los genes de las presenilinas. Existe un cuarto gen, el de la apolipoproteína E (ApoE), producida por astrocitos y microglía de manera normal en el sistema nervioso central, cuya isoforma  $\epsilon 4$  aumenta la susceptibilidad, tanto para la forma esporádica como familiar. La expresión de ApoE puede ser promovida como respuesta al estrés o daño neuronal (Mendiola-Precoma y col., 2016). En el Cuadro 2 se recopilan las funciones de genes asociados a la enfermedad, que se ven afectados por polimorfismos.

#### 1. 2. 2. 2 Otros factores

Actualmente las manifestaciones clínicas de la EA se han asociado a cambios en el metabolismo. Se sabe que los niveles altos de colesterol en sangre son un factor de riesgo, porque provoca efectos en el metabolismo de APP, así como en las actividades de  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\alpha$ -secretasas, por consiguiente, también la síntesis de A $\beta$ . Además, intermediarios del metabolismo de la cantidad excesiva del colesterol en el cerebro, como lo son el 24-hidroxicolesterol (24-OHC) y 27- hidroxicolesterol (27-OHC), se encuentran en pacientes con EA (Testa y col., 2016).

Cuadro 2. Polimorfismos Genéticos Asociados a la Enfermedad Alzheimer y su implicación funcional. (Elaborado de Mendiola-Precoma y col., 2016).

Gen	Función
ABCA7	Transporte de sustratos a través de membranas celulares.
CLU	Proteína chaperona activada por estrés involucrada en la apoptosis, regulación del complemento, transporte de lípidos, protección de la membrana e interacciones célula-célula.
CD33	Endocitosis mediada por el receptor independiente de clatrina.
CD2AP	Reorganización del citoesqueleto y tráfico intracelular.
B1N1	Regulación de endocitosis y tráfico, homeostasis del calcio y apoptosis.
PICALM	Montaje de clatrina.
MS4A	Asociado a respuesta inflamatoria.

Asimismo, la deficiencia de vitamina B12 y el ácido fólico, promueven niveles altos de homocisteína en sangre, que a concentraciones de 10-100  $\mu\text{mol/L}$  ejercen una acción directa al estimular excesivamente el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) cuya activación se ve alterada en la EA (Maron y Loscalzo., 2009). Se ha demostrado también en modelos de la EA que la inhibición farmacológica de la actividad de este receptor disminuye el efecto patológico de  $A\beta$  (Danysz y Parsons, 2012).

Se relacionan también la hipertensión, la atrofia cerebral y la generación de ovillos neurofibrilares, con aumento en la probabilidad de padecer la enfermedad (Mendiola-Precoma y col, 2016). Por otro lado, la relación que existe entre la obesidad y otros factores metabólicos, da pauta a que se presenten variadas patologías entre las que se pueden encontrar enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, síndrome metabólico, diabetes *mellitus* tipo 2 e incluso la propia hipercolesterolemia antes mencionada.

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un aumento del tejido graso y peso corporal, cuya causa principal es el desequilibrio energético, por consumo de una dieta hipercalórica y un bajo gasto de energía (Moreno, 2012), incrementan la secreción de citosinas proinflamatorias (Arteaga, 2012). La obesidad,

la diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) y la ingesta excesiva de grasas, particularmente saturadas, se encuentran estrechamente relacionadas con el daño cognitivo, y aumentan el riesgo de EA (Walker y Harrison, 2015; Mendiola-Precoma y col., 2017), la proteólisis del APP por la  $\beta$ -secretasa, el deterioro cognitivo y el daño mitocondrial. El aumento de tejido adiposo característico de pacientes con obesidad, incrementa la acumulación de lípidos y provoca cambios en la secreción de adipocinas proinflamatorias produciendo un aumento de TNF- $\alpha$ , IL-6 y la leptina. Ésta última favorece la fosforilación de tau y promueve la formación de ovillos neurofibrilares que afectan la estructura y función neuronal; la leptina puede encontrarse aumentada en la EA, sin embargo las bajas concentraciones de esta hormona aumentan el riesgo de padecerla. Por su parte la adiponectina además de regular la adiposidad y ser un sensor de la insulina, modula funciones cerebrales como la memoria ejerciendo un efecto protector en el hipocampo (Mendiola-Precoma y col., 2016).

### 1. 3 Signos y síntomas de la Enfermedad

La enfermedad tiene un inicio lento, pero progresivo que, en sus primeras fases, suele ser difícil de diferenciar del envejecimiento normal o de otras etiologías clínicas. Normalmente se sospecha de ella cuando se detecta la presencia de trastornos llamativos, ya sean cognitivos (memoria, lenguaje, orientación) o funcionales (independencia). Los síntomas suelen atribuirse a la edad, por lo que se vuelve difícil distinguir su verdadera causa; no obstante, deben ser tomados como importantes signos de alarma del deterioro (Peña-Casanova, 1999). La *Alzheimer's Association* de Estados Unidos ha establecido diez señales de advertencia de la EA y otros tipos demencia (Cuadro 3).

La evolución de la enfermedad depende de múltiples variables, así como del estado de salud y los cuidados a los que es sometido el paciente; está asociada a fenómenos cerebrales o hechos externos, por lo que no puede generalizarse el curso que ésta toma.

Cuadro 3. Signos de alarma de la enfermedad de Alzheimer (Modificado de Alzheimer's Association, 2018).

1. Cambios de memoria que afectan la vida cotidiana (citas, nombres, números de teléfono).
2. Dificultades para planificar o resolver problemas: cambios en la habilidad para desarrollar y seguir un plan.
3. Dificultad para llevar a cabo tareas cotidianas en el hogar o el trabajo: pueden tener dificultad para llegar a lugares conocidos, o recordar reglas.
4. Desorientación en el tiempo y espacio: El paciente se olvida de la fecha, se pierde.
5. Problemas de pensamiento abstracto: aparecen problemas de evaluación de semejanzas, comprensión.
6. Problemas con el uso de palabras al hablar o escribir: Tienen problemas para seguir una conversación o repiten mucho lo que dicen, incluso pueden olvidar el nombre de objetos.
7. Pérdida de cosas o ubicación en lugares incorrectos: olvidan dónde colocaron los objetos, aunque el evento haya sucedido minutos antes.
8. Pobreza de juicio: experimentan cambios en el juicio o en la toma de decisiones, prestan menos atención al aseo personal.
9. Pérdida de iniciativa: El paciente pierde el interés para ejercer pasatiempos, socializar o realizar proyectos en el trabajo.
10. Cambios en la personalidad: cambios repentinos de humor, suspicacia, temor.

Los síntomas de la enfermedad se desarrollan lentamente y empeoran de forma gradual a lo largo del tiempo; la enfermedad va de un estado leve-moderado a severo. Pueden clasificarse como síntomas psiquiátricos, síntomas conductuales y síntomas cognitivos.

### 1. 3. 1 Síntomas Psiquiátricos y Conductuales (neuropsiquiátricos)

Los síntomas psiquiátricos de la enfermedad surgen como consecuencia del impacto psicológico relacionado con el déficit cognitivo y los cambios neuroquímicos, dentro de estos se encuentran: ideas delirantes que constituyen la causa más común de

consultas médicas, alucinaciones en las cuales los pacientes pueden ser conscientes de la falsedad del fenómeno o bien, pueden actuar en función de lo falsamente percibido; falso reconocimiento como resultado de delirio y pueden dar lugar a interpretaciones anómalas; la depresión que se presenta entre el 40% y el 50% de los casos, puede explicarse como una reacción a la pérdida de las capacidades. Se han sugerido varias hipótesis para explicar dicho problema:

a) Una alteración provocada por la presencia de cambios neurobiológicos en el cerebro de estos sujetos, específicamente asociada a alteraciones en los sistemas de neurotransmisión al igual que con ciertas estructuras cerebrales, como problemas de metabolismo lento en las regiones frontales superiores bilaterales y en la corteza izquierda.

b) Los factores psicológicos, sociales y ambientales que pudieran incidir negativamente en el estado de ánimo de las personas (Arango y Fernández., 2003).

Por otra parte, entre de los síntomas conductuales se encuentran la ansiedad, acompañada de excitabilidad del sistema nervioso autónomo, que afecta aproximadamente al 40% de los pacientes; agitación o agresión, estado bajo el cual los pacientes pueden dañar el entorno, a las personas o autolesionarse; alteraciones de personalidad, presentes en un aproximado del 70% de los pacientes (Peña-Casanova,1999) las personas se vuelven irritables, desinhibidas, apáticas o suspicaces; existen alteraciones del sueño, insomnio y alteraciones del ritmo diurno, cambios de apetito y conducta alimentaria, al apetito puede aumentar o disminuir. También hay cambios en la actividad sexual, que pueden manifestarse de distintas formas, lo más común es una disminución en el deseo e interés sexual. Alteraciones de la actividad psicomotora, incluye deambulación errante, seguimiento persistente del cuidador, actos y manipulación repetidos. Se estima que el 64.7% de los pacientes con esta enfermedad experimentan síntomas psicológicos y conductuales (Garzón-Patterson y Pascual-Cota., 2015).

### 1. 3. 2 Síntomas de Ámbito Funcional

Antes de describir estos síntomas, es importante saber que se presentan como una desviación en las actividades de la vida cotidiana del paciente, entendiéndose como tal, el conjunto de conductas que una persona ejecuta con frecuencia casi cotidiana, para vivir de forma autónoma e integrada en su medio ambiente, y para cumplir su papel social (Baztán y col., 1993). Este conjunto de actividades se ven afectadas por la enfermedad de Alzheimer de tal forma que el comer, vestirse, bañarse, controlar esfínteres y demás actividades que podrían considerarse sencillas, se vuelven un reto para el paciente, llegando a resultar imposibles en los casos más graves, por lo que la asistencia de familiares o personas cercanas es indispensable.

### 1. 2. 3 Síntomas Cognitivos

En el ámbito cognitivo los síntomas se manifiestan en distintas áreas y diferente gravedad. La alteración de la memoria es el elemento medular de la enfermedad, se presentan trastornos de memoria episódica a largo plazo (de acontecimientos o eventos) es decir, comienzan a observarse olvidos progresivos que afectan acontecimientos vividos recientemente, como haber ido a visitar a una persona y no recordarlo; luego se van olvidando recuerdos cada vez más antiguos (amnesia retrógrada), como pueden ser el nombre de familiares, o su domicilio, por ejemplo. Estos trastornos llevan al paciente a un estado de desorientación del tiempo y espacio.

Se afecta también la memoria de trabajo, responsable de mantener temporalmente la información en la mente y manipularla mientras se realizan tareas mentales, entonces el paciente tiende a fallar en tareas que requieren planificación, control, razonamiento y resolución de problemas o seguimiento de una conversación grupal. Al alterarse la memoria semántica se pierden los conocimientos adquiridos a lo largo de la vida, los gestos y palabras; la memoria procesal (de aprendizajes no conscientes), sorprendentemente es posible que la persona pueda aprender tareas nuevas, aunque de forma no consciente (Garzón-Patterson, 2015).

Conforme avanza la enfermedad se van perdiendo la orientación espacial y del tiempo, así como la información referente a su propia identidad, de familiares y personas de su círculo social; dejan de reconocerse objetos e imágenes, la escritura debido al daño en la corteza asociativa visual, situada en los lóbulos occipitales y las zonas cercanas de los lóbulos parietales (Peña-Casanova, 1999).

En las primeras fases de evolución de la EA los trastornos de la lengua (afasia) no son muy evidentes, comienzan con dificultad para pronunciar palabras hasta llegar a la ausencia total del lenguaje. Se presentan también trastornos de lectura (alexia), pero de una manera muy sutil; de escritura (agrafia); hay pérdida de expresión gesticular (apraxia), incluso se pierde la capacidad de vestirse, esta patología se presenta en casos de Alzheimer más avanzados. El síndrome dis-ejecutivo se manifiesta en múltiples versiones, desde una reducción en el movimiento hasta cambios de personalidad.

#### 1. 4 Factores Etiológicos

Las causas por las cuales se origina la enfermedad pueden ser variadas, pues según lo propuesto existen una serie de hipótesis que pueden explicar su manifestación, sin embargo, no se cuenta con una que explique en su totalidad el complejo proceso de la enfermedad. La EA se caracteriza por la degeneración progresiva y específica de las neuronas de la corteza cerebral y de algunas estructuras subcorticales, dando lugar al deterioro funcional del cerebro que está determinado por la acción de tres procesos principales (Figura 1) (Tuneu y col., 2005).

- Formación de las placas seniles (los depósitos extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide) y de ovillos neurofibrilares (causadas por fosforilación de la proteína Tau) que constituyen las lesiones específicas de la EA.
- Alteración en la producción de neurotransmisores; hipofunción colinérgica e hiperfunción glutamatérgica.
- Apoptosis (muerte celular programada) de neuronas.

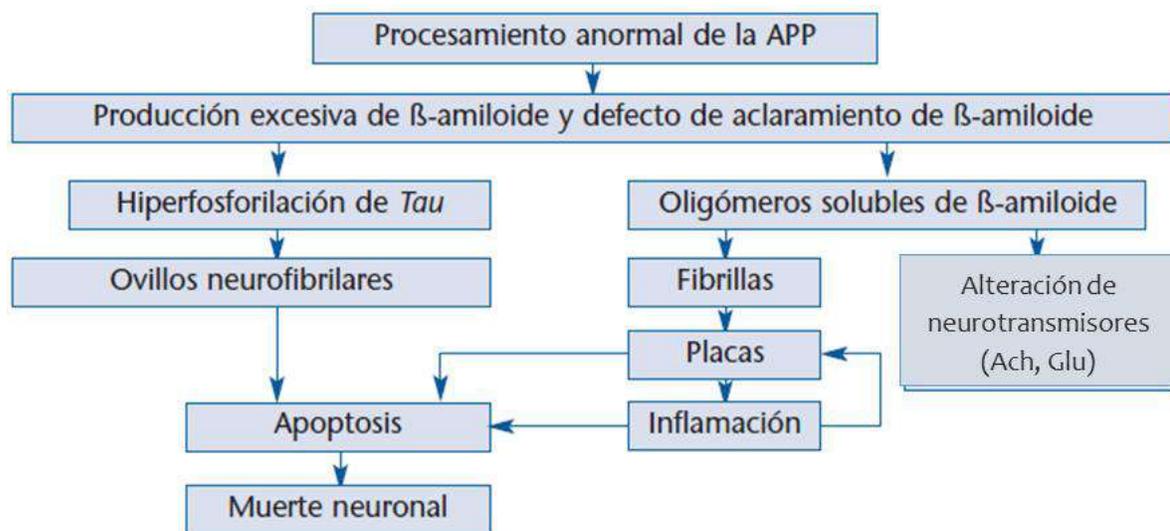


Figura 1. Etiología del Alzheimer. (Modificado de Tuneu y col., 2005).

#### 1. 4. 1 Acumulación del péptido $\beta$ -amiloide en placas seniles

El péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) es una proteína de 40 a 43 aminoácidos, cuya longitud depende del sitio en el que es escindido, pero no modifica de manera importante su capacidad de formar agregados proteicos, forma parte de la APP, que se encuentra incrustada en la membrana neuronal y está relacionada con fenómenos como la plasticidad neuronal, la extensión de las ramas neuronales, formación de sinapsis y del esqueleto neuronal, la regulación del calcio que entra en el interior de las neuronas y otros procesos. La APP es fragmentada por las enzimas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha$ -secretasas cerca del fragmento  $A\beta$ ; (Figura 2), dando origen a diferentes fragmentos, uno de ellos es la forma  $A\beta$ , causante de la EA. El péptido  $\beta A$  consiste en al menos dos secciones con diferentes propiedades: un fragmento hidrofóbico, que se estructura de manera ordenada, se conoce como hoja  $\beta$  y un segmento cuya composición permite que se mantenga en forma desordenada o se estructure como hoja-  $\beta$  (Guzmán-Vélez y col., 2016), que es la forma patológica de  $\beta A$  que da origen a los depósitos tóxicos de amiloide en el cerebro.

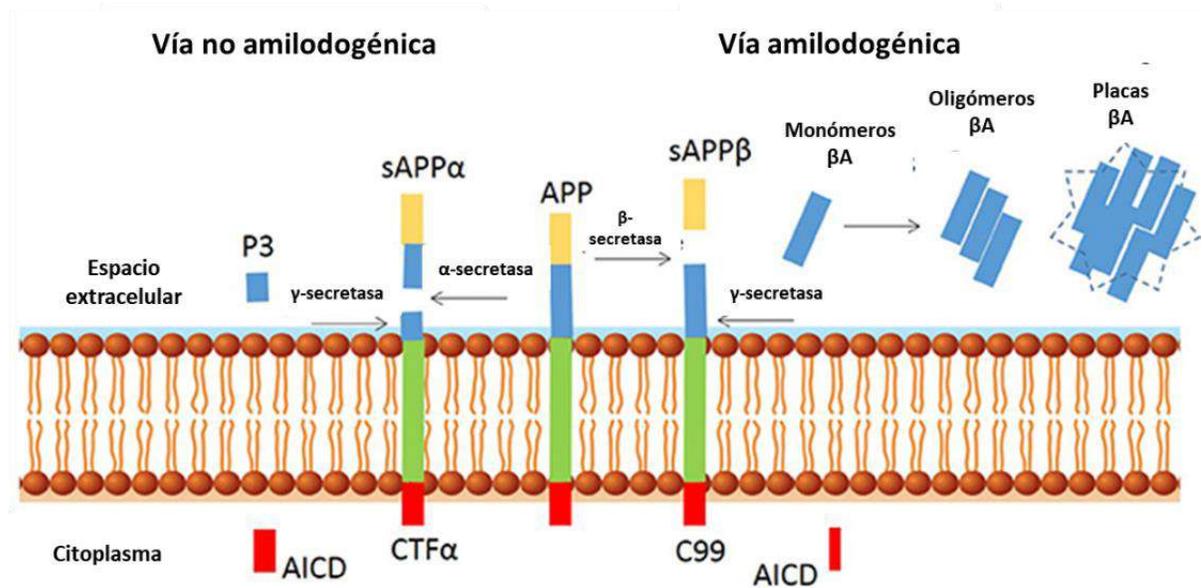


Figura 2. Procesamiento proteolítico de APP. (Modificado de Sumner y col., 2018).

La vía amilodogénica produce péptidos amiloides derivados de la acción enzimática de  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas en la APP, distribuidas en la membrana de las neuronas; mientras que la vía no amilodogénica produce fragmentos  $\alpha$ APP no tóxicos que se generan por la acción de  $\alpha$ -secretasas solubles y tienen un efecto neuroprotector. La hipótesis de los depósitos de amiloide de las placas seniles es fundamental en el desarrollo de la demencia de Alzheimer y actualmente es la que cuenta con mayor aceptación, ya que esta sustancia al acumularse se vuelve tóxica para las neuronas. La hipótesis plantea que la aglomeración de  $A\beta$  en forma placas neuríticas, difusas o como formas oligoméricas en el cerebro es la principal causa etiológica de la EA (Mendiola-Precoma y col., 2016).

#### 1. 4. 2 Hiperfosforilación de Tau

La proteína tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), que se expresa principalmente en neuronas. Participa en el ensamble de monómeros de tubulina dentro de los microtúbulos, para dar lugar a la red de microtúbulos neuronales que; contribuyen al mantenimiento de la forma celular y sirven como vía de transporte a través de los axones; también establece vínculos

entre microtúbulos y otros elementos del citoesqueleto, como los neurofilamentos u otras proteínas como son espectrina y filamentos de actina (García y Jay, 2002).

Esas actividades son reguladas en gran parte por estado de fosforilación de tau, que controla la estabilidad del citoesqueleto. La ciclina-dependiente de quinasa 5 (cdk5) o cinasa de tau II (TPKII), es una de las principales cinasas que fosforilan a tau, se encuentra distribuida en varios tejidos y líneas celulares. La proteína tau al verse químicamente modificada por el exceso de fosforilación, pierde su capacidad funcional normal y hace que las neuronas pierdan su estructura por la formación de ovillos neurofibrilares, que son pares de filamentos formados por agregados anormales de proteínas tau, que están dentro de las neuronas. La fosforilación anormal de tau evita su unión a microtúbulos y estimula modificaciones en GSK3 $\beta$ , la cinasa involucrada en la fosforilación aberrante de tau, que parece estar implicada en la patología de EA, (García-Rodríguez, 2014), de tal forma que se promueve aún más la patología.

### 1.5 Alteraciones en Sistemas de Neurotransmisores en Alzheimer

Los neurotransmisores son moléculas químicas encargadas de transmitir la información de una neurona a otra, y su alteración en la transmisión sináptica puede asociarse al deterioro cognitivo en la EA. Destaca la afección de los grupos de neuronas que usan acetilcolina como neurotransmisor; éstas se sitúan sobre la corteza cerebral, el núcleo basal de Meynert que establece conexiones colinérgicas a toda la corteza; el tronco del encéfalo y el estriado. La alteración del sistema colinérgico, específicamente una reducción en la síntesis de acetilcolina, en el núcleo basal de los pacientes con EA afecta la activación cerebral y la capacidad de memoria, por lo que no es de sorprenderse que las terapias farmacológicas estén dirigidas a tratar este sistema (Peña-Casanova, 1999).

#### 1. 5. 1 Sistema Neurotransmisor de Acetilcolina

Los receptores acetilcolina-nicotínicos son indispensables para llevar a cabo procesos cognitivos y de aprendizaje, y su deficiencia en la enfermedad de Alzheimer

se asocia a la acumulación de péptido A $\beta$  amiloide y Tau. De acuerdo a evidencia experimental se sabe que el péptido  $\beta$ -amiloide se une a receptores nicotínicos  $\alpha$ -7 de acetilcolina, reduciendo la corriente nicotínica  $\alpha$ -7, y por lo tanto la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula. La nicotina incrementa también la producción de factores neurotróficos en el cerebro y protege al SNC (Rubio-Pérez y Morillas-Ruiz, 2012).

En pacientes con EA los receptores muscarínicos, así como el acoplamiento de Ach, se reducen (Rubio-Pérez y Morillas-Ruiz, 2013); de igual forma lo hacen las enzimas colina acetiltransferasa (CAT), que se encuentra principalmente en los axones colinérgicos presinápticos (Gandía y col., 2006; Rugeles-Castañeda, 2006); y la acetilcolinesterasa (AChE). La deficiencia en la activación de los receptores nicotínicos o muscarínicos M1 se traduce en la inactivación de la proteincinasa C, afectando el procesamiento de la APP y favorecen la hiperfosforilación de Tau (Gandía y col., 2006).

Algunos estudios sugieren que hay un acoplamiento anormal de los receptores muscarínicos y las proteínas G que actúan como segundo mensajero, alterando la transducción de la señal posterior a la estimulación del receptor (Rugeles-Castañeda, 2006). Además, en la última etapa de la enfermedad, los receptores de neurofinas colinérgicas del encéfalo, responsables de promover la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas y células gliales que intervienen en el aprendizaje; se ven reducidas (Rubio-Pérez y Morillas-Ruiz, 2012).

#### 1. 5. 2 Sistema Neurotransmisor de Serotonina

En la EA también se ven afectados los núcleos dorsales del rafe del tallo del encéfalo por la formación de ovillos neurofibrilares (ONFs) provocando la pérdida neuronal y, por consiguiente, la de terminales serotoninérgicas en el neocórtex; al ser éstos la principal fuente de serotonina, se produce una disminución en las concentraciones de este neurotransmisor y del ácido 5-hidroxiindol acético (5 HIAA), en el cerebro, de manera importante en los lóbulos temporales, en el neocórtex así como en el líquido cefalorraquídeo De esta forma se pueden explicar los síntomas psiquiátricos

que se observan en esta patología (ansiedad, depresión, psicosis, trastornos del sueño, etc).

De la misma forma se ve afectado el *locus coeruleus*, fuente primordial de noradrenalina del SNC, en el mesencéfalo; al formarse ONFs. Sin embargo, en este caso la pérdida neuronal es mayor, alrededor del 40 y 80 %. Se ha encontrado además que disminuyen en un 10 a 30% los niveles de noradrenalina y la enzima encargada de sintetizarla, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, en el neocórtex. Esta alteración de la dopamina se asocia a la depresión de los pacientes (Rugeles-Castañeda, 2006).

#### 1. 5. 3 Sistema Neurotransmisor de Ácido $\gamma$ -aminoburtírico (GABA)

Las bajas concentraciones de ácido  $\gamma$ -aminoburtírico (GABA), neurotransmisor inhibitorio han sido asociados a la EA, sin embargo, solo se presenta en algunos casos en los que se relaciona con un déficit cognitivo. GABA actúa como un modulador de otros neurotransmisores, entre ellos serotonina y dopamina, por lo que se cree que desempeña un papel importante en la etiología de los síntomas conductuales (Rugeles- Castañeda, 2006).

#### 1. 5. 4 Sistema Neurotransmisor de Glutamato

El neurotransmisor excitatorio más importante del SNC es el Glutamato (Glu) y su transmisión sináptica está regulada por receptores ácido- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) (Hao y col., 2015). En las personas con EA el Glu se manifiesta de forma excesiva en la hendidura sináptica produciendo excitotoxicidad y la posterior muerte celular. Se ha encontrado que oligómeros de  $\beta$ A solubles dificultan la transmisión sináptica, de forma específica la plasticidad neuronal mediada por Glu y sus receptores NMDAR y mGluR5, así como su liberación. Se ha documentado que  $\beta$ A induce a los mGluR5 y MNDAR a activar caspasas-3 que se atribuye a la inhibición de la potenciación a largo plazo o LTP (Long-Term Potentiation) y favoreciendo la depresión a largo plazo o LTD (Long-Term depression) en proceso de memoria y aprendizaje (Díaz, 2014).

El péptido  $\beta A$  induce a la liberación excesiva de Glu en la hendidura sináptica, lo que favorece la sobre activación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de Glu; la acumulación del péptido en esta zona permite, particularmente, la interacción con los mGluR5, pues  $\beta A_{1-42}$  se une a la membrana neuronal acumulándose en las zonas de sinapsis excitatorias, afectando estos receptores al alterar su distribución y reducir su movilidad; se impide entonces el intercambio de glutamato entre sinapsis y su localización (Figura 3). Se produce una activación excesiva del receptor mGluR5, manifestándose como un aumento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  en el interior de la célula y la eliminación de los NMDAR (Díaz, 2014). Esta alteración del sistema neurotransmisor de Glu no solo observa en enfermos de Alzheimer, sino también en otras patologías como en la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (Rubio-Pérez y Morillas-Ruiz 2012).

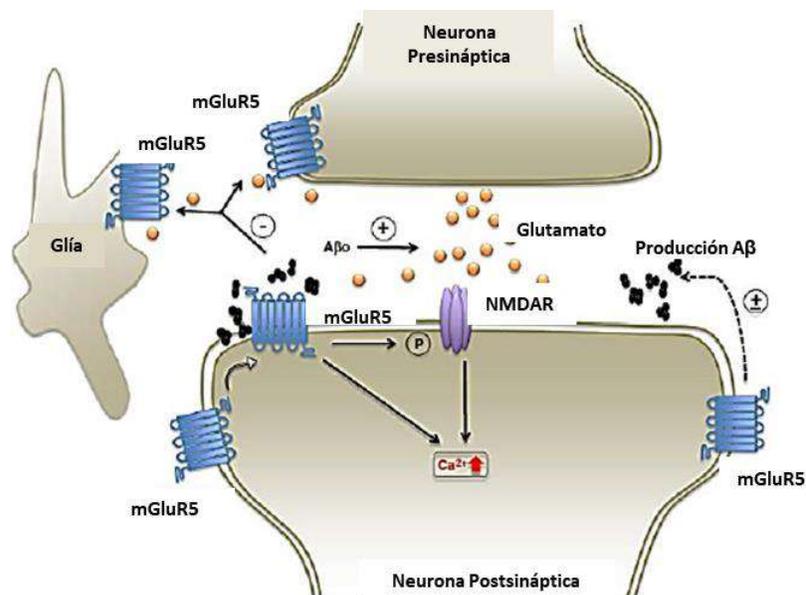


Figura 3. Implicación de  $\beta A$  y los receptores metabotrópicos de Glutamato. (Modificado de Díaz, 2014).

La regulación de los AMPAR dentro y fuera de la sinapsis excitatoria es importante para controlar la potenciación a largo plazo, la depresión a largo plazo y otras formas de plasticidad sináptica, y ésta depende de composición de la subunidad del receptor. En el hipocampo la mayoría de los AMPAR son hetero-oligómeros de glutamato A (Glu A) / Glu A2 y dependen de la actividad de la LTP. La fosforilación

de éste receptor media inserción en la membrana plasmática del receptor AMPA y su inserción en la sinápsis. Se ha demostrado que los oligómeros A $\beta$  alteran este mecanismo al modular proteínas quinasas o fosfatasa (Hao y col., 2015).

#### 1. 5. 5 Sistema Neurotransmisor de Dopamina en enfermedad de Alzheimer

Las concentraciones de dopamina (DA) y ácido homovalínico corticales no presentan alteraciones significativas en EA, pero se sabe que puede darse la pérdida de algunas pocas neuronas de la sustancia negra, y del área tegmental ventral, con mínima formación de ovillos (Rugeles-Castañeda, 2006). No obstante, se sabe que el receptor de dopamina 1 (D1R) y el receptor de dopamina 2 (D2R) intervienen en la modulación de los mecanismos fisiológicos de plasticidad neuronal; además, interactúan con los receptores de acetilcolina y glutamato, influyendo así en la modulación de la ansiedad, aprendizaje y la memoria. Se ha demostrado la disminución de D2Rs en pacientes con EA, sin alteraciones del movimiento y cuando se presenta en las zonas del hipocampo y el estriado, se relaciona con la pérdida de la memoria verbal y la aparición de síntomas no típicos de la enfermedad (Díaz, 2014).

Por otra parte, la reducción de la señalización de D2Rs en esta zona ejerce una acción protectora contra la toxicidad que se genera por los agregados de tau. Por esta razón, una de las estrategias terapéuticas es la acción antagonista de estos D2Rs tienen un potencial efecto protector contra la formación de agregados de tau y la neurotoxicidad (McCormick y col., 2013). Se cree que la protección a la formación de agregados de tau y su consecuente neurotoxicidad se debe a efectos de la señalización aguas abajo tras la inhibición del D2R producida directamente por un efector como PKA que media la fosforilación de tau; o indirectamente a través de un receptor que responde a un factor de transcripción CREB (McCormick y col., 2013).

Se ha demostrado que la activación del D1R utilizando L-estefolidina (L-SPD) mejora la expresión superficial de los receptores AMPA, la plasticidad neuronal y el aprendizaje, en el hipocampo de ratones APP/PS1. Se observó además que la

activación la vía de señalización D1/ PKA en las neuronas de esta zona frena la disfunción (Hao y col., 2015).

La activación del D1R conduce a un aumento de cAMP, lo que eleva la activación de PKA y a su vez fosforila el residuo S845 en la subunidad Glu-A1, aumentando la exocitosis de los receptores Glu-A1. En un ambiente que se mantiene en estas condiciones activa receptores  $\beta_2$  adrenérgicos y de señalización río abajo AMPc/PKA, facilita la señalización en el hipocampo y evita el deterioro de la plasticidad sináptica del hipocampo por oligómeros  $\alpha\beta$ A. Por su parte los D2R al estar acoplados a proteínas G con subunidad  $\alpha$ -i/AMPc conducen a la inactivación de PKA (Hao y col., 2015).

Según lo reportado en bibliografía los receptores a Adenosina A1 y A2 ejercen un efecto antagónico de los receptores a dopamina, se tiene entonces que el receptor A1 inhibe la actividad del D1R y A2 la actividad de D2; esto se debe a la interacción que se forma a través de heterodímeros proteína-proteína (Moratalla, 2008).

#### 1. 6 Diagnóstico de la Enfermedad

El diagnóstico para el Alzheimer sigue un criterio clínico que implica alteraciones cognitivas y conductuales, que producen un deterioro importante en la funcionalidad de la persona, afectando su desempeño en las actividades básicas e instrumentales de la vida diaria, requiriendo asistencia diaria (Knopman y col., 2001). El diagnóstico se realiza de forma positiva, por el reconocimiento de las características de la enfermedad y aplicando una serie de criterios ampliamente utilizados en todo el mundo; entre ellos los de la quinta edición del “Diagnostic and Statical Manual of Mental Disorders” (DSM-V); y de manera conjunta, los del “National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke” y la “Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association” (NINCDS/ADRDA), que evalúan los síntomas neuropsicológicos. Adicionalmente, se relizan pruebas de laboratorio para evaluar productos del estrés oxidativo, concentraciones de  $A\beta$ , metabolitos del colesterol y citosinas proinflamatorias, en sangre y líquido cefalorraquídeo. Además de

exámenes de neuroimagen por resonancia magnética (RMN) y tomografía por emisión de positrones (PET) (Mendiola-Precoma y col, 2016).

## 1. 7 Tratamientos

Actualmente no existe un medicamento que frene o cure la EA; los tratamientos farmacológicos están dirigidos a los síntomas de la enfermedad, con el fin de mejorar las funciones cognitivas y las alteraciones de conducta. Básicamente existen dos grupos de fármacos; los anticolinesterásicos y los moduladores de la transmisión glutamatérgica.

El deterioro cognitivo se encuentra directamente relacionado con la deficiencia de la acetilcolina (Ach) debido a la degradación de la misma por la enzima acetilcolinesterasa (ACE); por lo que una de las estrategias es el uso de fármacos inhibidores de la ACE como el Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina, que favorecen la disponibilidad de la Ach en el cerebro. Particularmente la Galantamina tiene actividad agonista sobre los receptores nicotínicos presinápticos; y la Rivastigmina inhibe también a la enzima butirilcolinesterasa lo que permite controlar los trastornos conductuales y otros síntomas como la apatía y el déficit de atención. El antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) de primera elección es la Memantina, que bloquea de manera no competitiva el receptor NMDA y permite regular su activación excesiva, que en la EA tiene efectos neurotóxicos. Existen otros tratamientos como la administración de cerebrosilina o la vitamina E que muestran ser eficaces en el tratamiento de otros síntomas, sin embargo, su uso no se encuentra sugerido como opción terapéutica de la EA. Si bien estos fármacos permiten controlar los síntomas, su administración produce efectos secundarios que pueden ir desde náuseas y vómito en el caso de los inhibidores ACE, hasta anorexia o psicosis en el caso de la Memantina. La aprobación de nuevos fármacos para el tratamiento de la EA por la FDA y la EMA es un proceso complejo, pues requiere que el medicamento además de cumplir con las pruebas farmacológicas, garantice su seguridad y eficacia de uso. Desde el 2006 y hasta el 2015, no han sido aprobados nuevos medicamentos (López-Locanto, 2015).

### 1. 7. 1 Tratamiento con productos naturales

Debido a la complejidad del proceso para la aprobación de nuevos medicamentos para la EA, se han buscado moléculas alternativas con potencial terapéutico o preventivo, por lo que los productos naturales son los de primera elección. Las xantinas son productos naturales, que en una u otra forma han sido utilizados desde la antigüedad por sus efectos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) porque actúan como estimulantes de éste. Estructuralmente son derivados purinérgicos, formados por heterociclos pirimidina e imidazol condensados, que dan lugar a las metilxantinas más conocidas: cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina), teofilina (1, 3 dimetilxantina) y teobromina (3, 7 dimetilxantina) Figura 4 (Moratalla, 2008).

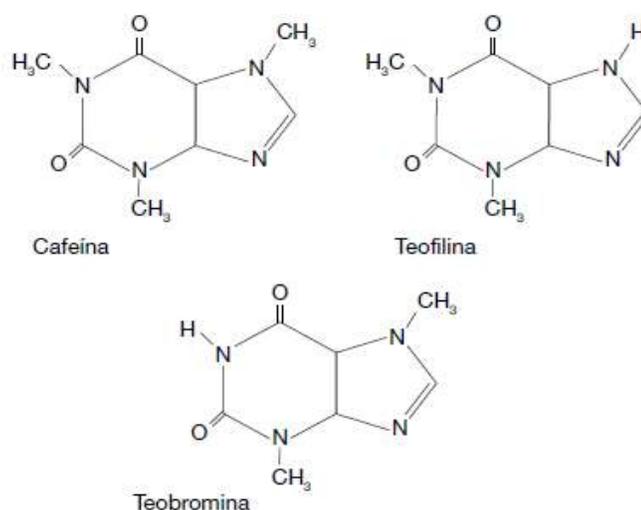


Figura 4. Estructura Química de las metilxantinas. (Modificado de Moratalla, 2008).

Las metilxantinas ejercen acción sobre los receptores a Adenosina A1 y A2 principalmente. La estimulación de los receptores a Adenosina A1 disminuye la concentración de AMP cíclico (AMPC) al asociarse a proteínas Gi/Go; se encuentra especialmente en el hipocampo, corteza cerebral, núcleos talámicos, globo pálido y en el estriado, y median la liberación de glutamato, dopamina y acetilcolina. Por su parte los receptores A2 aumentan las concentraciones de AMPC porque están acoplados a proteínas Gs/Go y estimulan a la adenilil ciclase, la producción de adenosín monofosfato cíclico y la proteína quinasa (Moratalla, 2008). Actualmente se

cree que la cafeína puede ralentizar la progresión de la enfermedad en pacientes que ya han desarrollado la EA (Flaten y col, 2014).

### 1. 7. 2 Teobromina

La teobromina es una molécula perteneciente al grupo de las metilxantinas que actúa como antagonista de receptores de adenosina acoplados a proteína G. Dicha acción se debe a las características estructurales que comparte la teobromina con el ligando natural de los receptores A1 y A2, como puede observarse en la Figura 5; este compuesto tiene una vida media en plasma de 10 horas (Martínez-Pinilla y col, 2015).

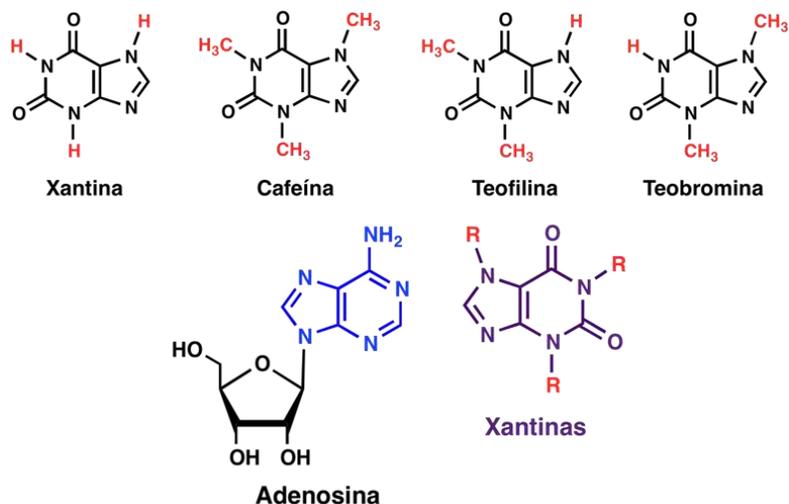


Figura 5. Similitud estructural de las metilxantinas con la Adenosina (Modificado de Martínez-Pinilla y col., 2015).

La teobromina es útil en casos de asma, y otros problemas del tracto respiratorio por su potencial antiinflamatorio, al disminuir las citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma o factor de necrosis tumoral alfa; además reduce la toxicidad celular causada por la generación de óxido nítrico (PubChem, 2016).

La teobromina al igual que la cafeína es capaz de formar complejos no covalentes con ATP. Puede unirse al ADN en concentraciones milimolares con una constante de unión de ADN-Teobromina  $=1.1 \times 10^3 M^{-1}$ ; en el análisis FTIR se reveló que la teobromina interactúa con todos los pares de bases del ADN y el grupo fosfato por la formación de un puente de hidrógeno. Se observó que en presencia de  $Mg^{2+}$ , se

modifica la estructura del ADN (Johnson y col., 2012). En un estudio experimental se observó que la teobromina también interactúa con el ARN y, a pesar de que no se ha dilucidado el mecanismo de acción, este hallazgo hace suponer que la interacción ADN-ARN después del consumo de metilxantinas en el cacao, podría inducir o reprimir la expresión génica (Martínez-Pinilla y col., 2015). Esto la vuelve una posibilidad muy atractiva con potencial de disminuir el riesgo de enfermedades neurodegenerativas (Eskelinen y col., 2011) asociadas a riesgo genético, como lo es la EA de tipo hereditario.

En estudios recientes orientados a determinar las propiedades curativas de este compuesto, indican que la teobromina está orientada a un perfil A $\beta$  favorable en líquido cefalorraquídeo (Travassos y col., 2015) y un compuesto que puede ser utilizado para el tratamiento de la enfermedad. Según bibliografía reportada, la teobromina mejoró las funciones cognitivas y los evitó el aumento en los niveles de A $\beta$  de un modelo experimental de EA inducida por una dieta alta en grasas, utilizando dosis de 30 mg/L de agua potable (Mendiola-Precoma y col., 2016).

Otro efecto farmacológico que posee la teobromina es la protección cardiovascular por el aumento en los niveles de colesterol HDL y disminución del LDL, debido a un mecanismo multifactorial (Martínez-Pinilla y col., 2015), lo que la vuelve prometedora para evitar el deterioro cognitivo y de memoria a largo plazo asociado a una dieta alta en grasas (Mendiola-Precoma y col., 2016).

## **2. HIPÓTESIS**

La teobromina induce cambios en la expresión de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 de la corteza prefrontal en el encéfalo de rata de un modelo para la enfermedad de Alzheimer esporádico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3. 1 General**

Evaluar los cambios inducidos por teobromina sobre la expresión de receptores Dopaminérgicos D1 y D2, en el encéfalo de rata de un modelo para la enfermedad de Alzheimer.

#### **3. 2 Específicos**

- Inducir la enfermedad de Alzheimer esporádico por una dieta alta en grasas con manteca de cerdo, en un modelo murino experimental.
- Evaluar los cambios en la expresión de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la corteza prefrontal de un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer esporádico.
- Evaluar el efecto de la teobromina en la expresión de receptores dopaminérgicos D1y D2 en la enfermedad de Alzheimer.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

#### 4. 1. 1 Reactivos

- Solución buffer de sales de fosfatos (PBS) 1X
- Solución de para-formaldehído (PFA) al 4%
- Sacarosa al 30% en PBS 1X
- Solución de buffer de fosfato en tritón X-100 (PBT)
- Solución de PBT 0.5% con Tween 20
- Solución de NaOH 0.1N
- Solución SDS 1%
- Solución de etanol al 70%
- Pentobarbital Sódico
- Bovine Serum Albumin (BSA)
- Leche grado Bloqueo BIO RAD®
- Medio congelador de tejidos Tissue Freezing medium
- Anticuerpos
  - Anticuerpo 1° D1DR SC-14001 (conejo) Santa Cruz Biotechnology ®
  - Anticuerpo 1° D2DR SC-7523 (cabra) Santa Cruz Biotechnology ®
  - Anticuerpo 2° Anti-mouse FITC
- Tiras reactivas para determinación de triglicéridos ACCUTREND® GCT
- Tiras reactivas para determinación de colesterol ACCUTREND® GCT
- Acetona
- Nitrógeno líquido

#### 4. 1. 2 Materiales

- Material de disección
- Cajas Petri de plástico
- Tubos falcón de 50 ml
- Vasos de precipitado
- Probeta de 50 ml

- Jeringas de 20 ml
- Guillotina
- Etiquetas
- Laminillas
- Cubreobjetos

#### 4. 1. 3. Equipos

- Laberinto elevado de 8 brazos (longitud de cada brazo= 50 cm, ancho de cada brazo= 14 cm, diámetro del eje central 40 cm, altura de las paredes=40 cm, con base del piso de una altura de 56 cm)
- Criostato
- Microscopio confocal Zeiss LSM-700.

#### 4.2 Métodos

##### 4. 2. 1 Animales y tratamiento

Se utilizaron 3 grupos de ratas Wistar macho como se indica en el Cuadro 4. Grupos de estudio; de 6 meses de edad, las cuales fueron debidamente identificadas (Control, LED= Manteca, LED+30= Manteca + Teobromina). Los animales tuvieron un período de habituación de 15 días en el bioterio; de acuerdo a los tratamientos establecidos, se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*.

Cuadro 4. Grupos de Estudio.

Grupo	No. De Ratas por grupo	Tratamiento
Control	3	Dieta normal
LED	3	Dieta enriquecida con 33% de manteca
LED + 30	3	Dieta enriquecida con manteca al 33% y Teobromina 30 mg/L

Las condiciones que se mantuvieron durante el período de investigación en el bioterio, constaron de ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, bajo condiciones de ventilación y humedad adecuados, a una temperatura de aproximadamente 22°C (Mendiola-Précoma y col., 2016).

La duración del tratamiento fue de 6 meses, durante los cuales se realizaron evaluaciones de peso mensuales y pruebas conductuales de memoria espacial. Una vez terminado el período de prueba se dio un lapso de 15 días durante los cuales se mantuvo una dieta normal *ad libitum*. Posteriormente las ratas fueron sacrificadas siguiendo los principios de bioética, de acuerdo a lo estipulado por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio; el proyecto con No. de registro 63FCN2016 (Anexo A), fue autorizado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales.

#### 4. 2. 2 Pruebas Conductuales de Memoria

##### 4. 2. 2. 1 Test de Memoria espacial en laberinto de 8 brazos.

Para esta prueba se utilizó un laberinto radial elevado a 50 cm del suelo, compuesto de 8 brazos idénticos de 50 cm de longitud, 14 cm de ancho, unidos a una plataforma central con un diámetro de 40 cm y paredes de 40 cm de altura; de madera pintada, color negro (Figura 6). Previo a cada sesión, en cada una de las fases del experimento, los animales se sometieron a un período de abstinencia de agua y alimento por 24 horas. Antes de iniciar cualquier prueba, el laberinto se limpió con un paño y solución desodorizante o alcohol al 70%; se dejó reposar 10 min antes de iniciar la siguiente prueba.

##### Fase de Habitación.

En la primera etapa de esta fase, se permitió que los animales exploraran el laberinto por 20 minutos. Este procedimiento se repitió 3 veces, en días diferentes durante el primer mes. En la segunda etapa, a la entrada de 5 de los brazos del laberinto se

colocaron objetos cilíndricos de diferentes tamaños y colores (amarillo, rojo, azul, verde y/o naranja) y al final de los brazos 4 y 6 recipientes con agua, mismos que fungían como recompensa para la rata. Cada animal fue colocado en el brazo de inicio y se dio al menos 1 minuto y como máximo 5 minutos, para que el animal encontrara su recompensa (agua); registrando el número de veces que bebía del recipiente. Esto se repitió 3 veces en un día, por 3 días diferentes.

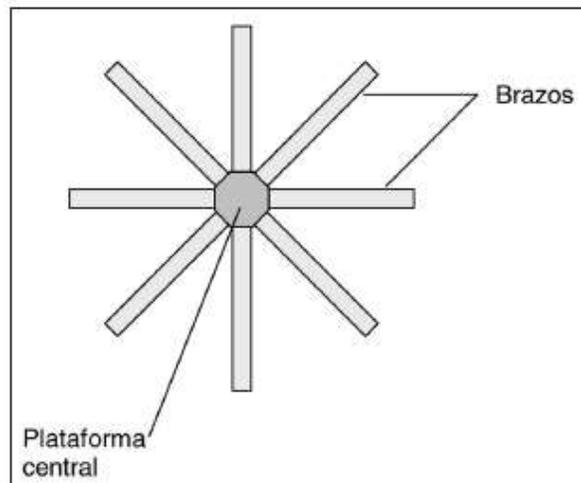


Figura 6. Laberinto de brazos radiales (Soto-Caro y Saavedra, 2005).

#### Fase de Entrenamiento y de Prueba

Para evaluar la memoria espacial se colocaron los objetos cilíndricos en la entrada de 5 brazos del laberinto; y 2 bebederos en los brazos 4 y 6. La fase de entrenamiento se realizó en el tercer mes y la de prueba en el quinto mes. El procedimiento de prueba fue exactamente igual al de la segunda fase de habituación. El tiempo de prueba fue de 5 minutos durante los cuales se registraron las entradas a cada brazo, así como el tiempo y número de veces que el animal entró a brazos correctos, es decir que encontraba la recompensa. Se consideró como entrada cuando al menos la mitad del cuerpo de la rata se estaba dentro del brazo del laberinto. En los casos en que el animal permaneció por más de 1 minuto en un brazo incorrecto (donde no había recompensa) la prueba se dio por terminada y se repitió posteriormente.

4. 2. 3 Determinación cuantitativa los de niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.

Se realizaron pruebas para medir los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre de cada uno de los sujetos de estudio al inicio y final del tratamiento, meses 0 y 6; para ambas pruebas se utilizaron tiras reactivas ACCUTREND®, para colesterol y triglicéridos respectivamente, así como instrumento ACCUTREND® GCT.

4. 2. 4 Disección del Tejido

Los animales fueron sacrificados 24 horas después de haber terminado las pruebas conductuales y el tratamiento de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico en dosis de 40 mg/Kg vía intraperitoneal. Una vez que el animal llegó a un plano quirúrgico de anestesia, se colocó en una bandeja de disección y sosteniendo cada una de las extremidades con agujas, exponiendo el parte tronco frontal. Con ayuda de unas pinzas se levantó la piel del área inferior torácica y se realizó una incisión de 5-6 cm; y se procedió a retirar la primera piel. Posteriormente se levantó nuevamente la piel, y con cuidado se hizo una pequeña incisión de la membrana con tijeras curvas hasta debajo de la caja torácica para exponer el corazón (Figura 7).

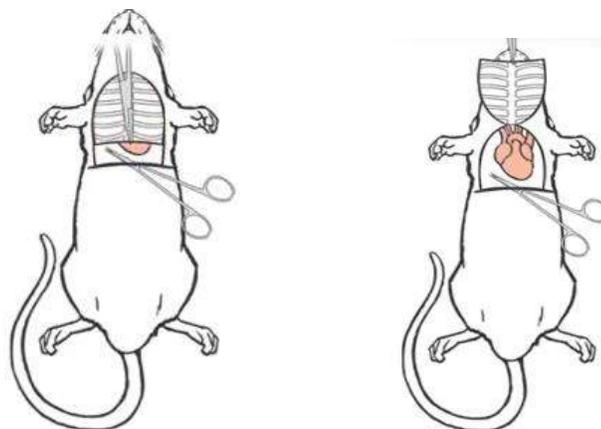


Figura 7. Representación esquemática de la disección. Incisión lateral a través del tegumento y la pared abdominal (Gage y col., 2012).

Para realizar la perfusión con paraformaldehído se conectó una jeringa con solución de PFA al 4% en buffer de fosfato 0.1 M al corazón y se inyectaron 60 ml aproximadamente; verificando que los tejidos perdieran la coloración roja característica, tomando un color claro indicativo de una buena perfusión (Figura 8).

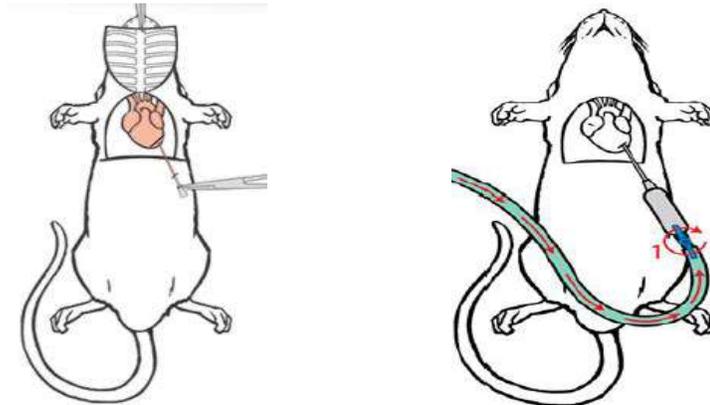


Figura 8. Representación esquemática de la Perfusión de tejido. (1) El catéter es sustituido por una jeringa de 20 ml en el desarrollo experimental (Gage y col., 2012).

Los animales fueron decapitados con ayuda de una guillotina y se hizo una incisión a lo largo del tegumento desde el cuello hasta exponer el área craneal. Se retiró la piel que se encuentra sobre la base del cráneo, hasta que éste fue expuesto; y se eliminó la musculatura residual. Con las gubias se realizó un corte que se extendía hasta el borde distal de la superficie del cráneo posterior; y otro corte idéntico del contralateral, posteriormente se retiró la estructura ósea que cubre el encéfalo. Una vez que el cerebro estaba expuesto se retiraron las meninges con ayuda de unas tijeras iris; y se procedió a retirar la estructura cerebral (Figura 9).

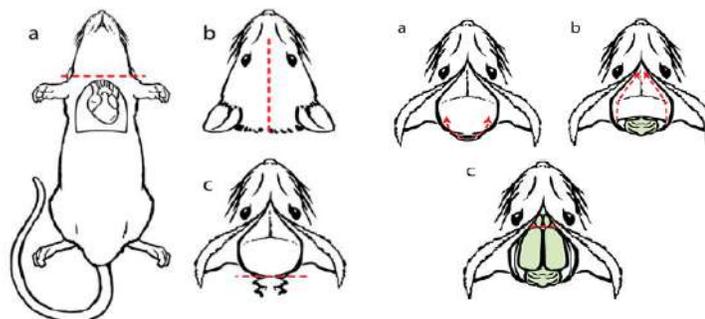


Figura 9. Representación esquemática de la extracción del encéfalo de rata (Gage y col., 2012).

#### 4. 2. 5 Fijación de Tejidos

Una vez extraído el tejido, se colocó en PFA al 4% en PBS durante aproximadamente 16 horas a 4 °C.

#### 4. 2. 6 Crioprotección de Tejidos

Transcurrido el tiempo de fijación, los tejidos se lavaron con PBS 1X, y se llevaron a una solución de sacarosa al 30% en PBS para su crioprotección. Posteriormente se realizaron 3 enjuagues con PBS 1X y se segmentaron las áreas de interés: cerebelo, corteza prefrontal e hipocampo; fueron montados en cajas de papel aluminio con medio congelador de tejidos Tissue freezing medium y congelados a -70°C para su conservación.

#### 4. 2. 7 Cortes del Tejido

Con la ayuda del criostato se realizaron cortes longitudinales de 12 µm, los cuales se colocaron en laminillas perfectamente identificadas y conservadas en congelación a -20°C.

#### 4. 2. 8 Inmunofluorescencia

Las laminillas preparadas anteriormente se colocaron dentro de una cámara húmeda con tapa, sobre soportes evitando el contacto directo con la base de la cámara. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno, colocando la solución en los bordes de la laminilla y evitando el contacto con el tejido. Entre cada lavado se escurrieron las laminillas cuidando no desprender el tejido.

Posteriormente, se adicionaron 300 µL del tratamiento bloqueador de albúmina sérica bovina (BSA) al 5%/Leche al 5%, a 16 °C en el interior de la cámara húmeda por 2.5 h, para bloquear uniones inespecíficas. Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se hicieron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente, se colocaron 300 µL de la solución de Anticuerpo 1° correspondiente (indicado en Cuadro 5) y PBS 1X al blanco. Se incubó toda la noche a 4°C.

Para retirar los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno, se agregó la solución de anticuerpo 2° de acuerdo las concentraciones indicadas en el cuadro 5 y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, protegiendo de la exposición a la luz con papel aluminio y en cuarto oscuro. Después del tiempo establecido, se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno, el primero con PBT 0.5% con Tween 20 y los dos posteriores con PBS 1X para retirar los anticuerpos secundarios; luego se adicionaron 2 gotas de DAPI (1:1) glicerol sobre la muestra, evitando la formación de burbujas, y se colocó un cubreobjetos. Finalmente las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia.

#### 4. 2. 9 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico por ANOVA con *posthoc* de Bonferroni, de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos; así como de la evaluación de peso corporal y pruebas conductuales.

Cuadro 5. Condiciones Experimentales.

Receptor D1				
Condiciones	Muestras			
	Blanco	Control	LED	LED+30
Bloqueo [BSA 5%/Leche 5%], 16°C, 2.5 h	300 µL	300 µl	300 µL	300 µL
Anticuerpo 1° D1DR SC-33660 [1:100], 4°C, toda la noche	-	300 µL	300 µL	300 µL
Anticuerpo 2° AM-FIT [1:1500], 16° C, 2 h, sin exposición a la luz	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Receptor D2				
Condiciones	Muestras			
	Blanco	Control	LED	LED+30
Bloqueo [BSA 5%/Leche 5%], 16°C, 2.5 h	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Anticuerpo 1° D1DR SC-33660 [1:100], 4°C, toda la noche	-	300 µL	300 µL	300 µL
Anticuerpo 2° AM-FIT [1:2000], 16° C, 2 h, sin exposición a la luz	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL

#### 4.3 Diseño Experimental

Cuadro 6. Diseño Experimental.

Grupo experimental	Actividad
	Adquisición de animales, formación de grupos e identificación. Se incluyeron 3 ratas por grupo.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control</li> <li>• Manteca</li> <li>• Manteca + Teobromina</li> </ul>	Fase de Habitación al bioterio Administración de dieta y tratamientos establecidos. La dieta alta en grasa se administró en el alimento con manteca de cerdo al 33% y el tratamiento con teobromina 30 mg/L de agua potable. Control de peso Pruebas conductuales de memoria: - Test de memoria espacial en laberinto de 8 brazos Determinación de colesterol y triglicéridos en sangre. Sacrificio y disección de tejidos Fijación, post fijación y crioprotección de tejidos Pruebas de Inmunofluorescencia
Análisis Estadístico de la cuantificación de triglicéridos y colesterol, así como de la evaluación de peso y pruebas conductuales; ANOVA con <i>posthoc</i> de Bonferroni.	

## 5. RESULTADOS

### Modelo Experimental

Para obtener la carga lipídica requerida se administró una dieta alta en grasas, principalmente colesterol y grasas saturadas (manteca de cerdo) en el alimento de los sujetos de prueba LED y LED+30, a este último grupo se suministró adicionalmente teobromina en una concentración de 30 mg/L; el grupo control recibió una dieta convencional. Se realizó un control de peso de cada uno de los sujetos de estudio mensualmente durante el tiempo de tratamiento (6 meses), mostrado en la Figura 10.

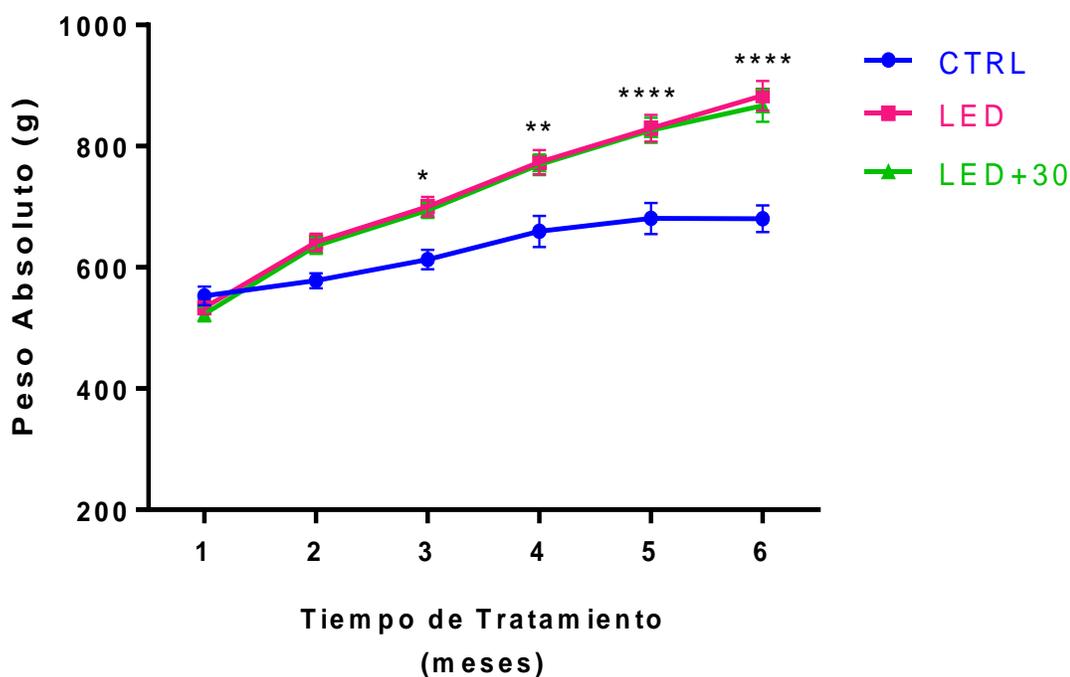


Figura 10. Control de Peso a través del tiempo. El análisis estadístico para el control de peso se realizó por ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

Los miembros de los grupos LED y LED+30 alimentados con una dieta enriquecida con manteca de cerdo mostraron una ganancia de peso estadísticamente igual entre

sí, pero significativamente diferente respecto al control, a partir del tercer mes (\*  $p < 0.05$ ); este comportamiento se mantuvo hasta el final del desarrollo experimental.

Con el fin de determinar la influencia de la dieta en los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos se midieron dichos marcadores en muestras de sangre al inicio y final del desarrollo experimental, utilizando tiras reactivas ACCUTREND® y el instrumento ACCUTREND® GCT. Los niveles de colesterol en plasma de los tres grupos de estudio Control, LED y LED+30 no mostraron variación significativa en los tiempos de análisis, resultados ilustrados en la Figura 11.

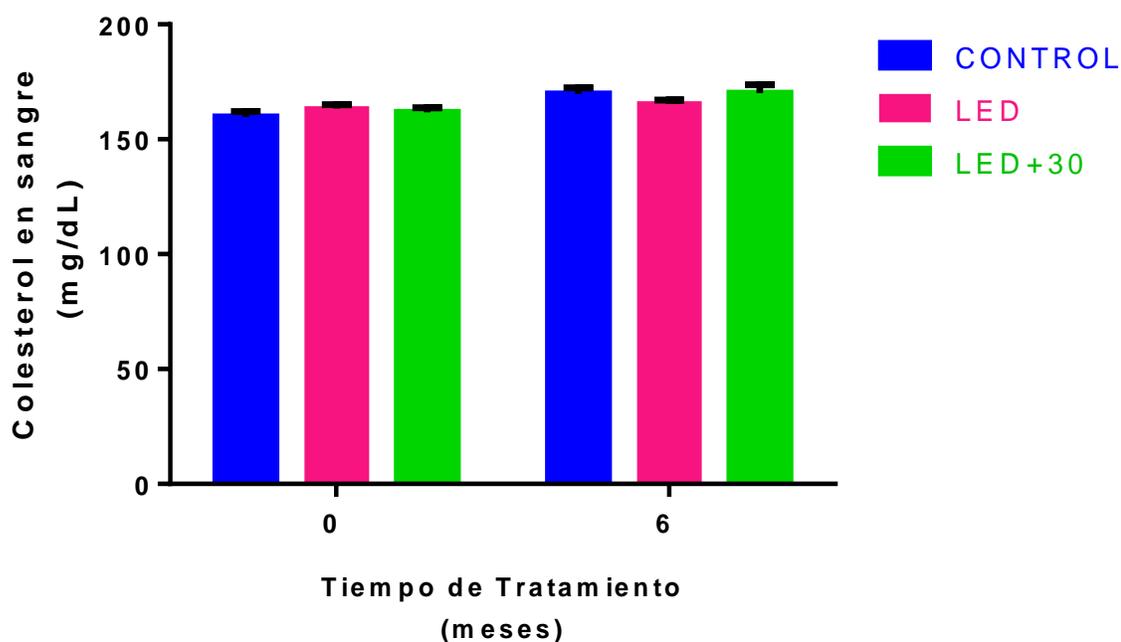


Figura 11. Niveles plasmáticos de colesterol. El análisis estadístico para los niveles plasmáticos de colesterol se realizó con ANOVA de dos vías utilizando como prueba *posthoc* Bonferroni.

La concentración de triglicéridos en sangre no presentó alteración estadísticamente diferente al inicio del tratamiento (Figura 12); y contrario a lo observado anteriormente al final del desarrollo experimental, se hizo evidente la variación significativa en los grupos LED (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) y LED+30 (\*\*\*)  $p < 0.001$ ); en ambos se observa un aumento de triglicéridos en torrente sanguíneo en comparación con el Control. Al

confrontar los grupos LED y LED+30, se determinó que éstos tuvieron el mismo comportamiento al inicio y final del ensayo.

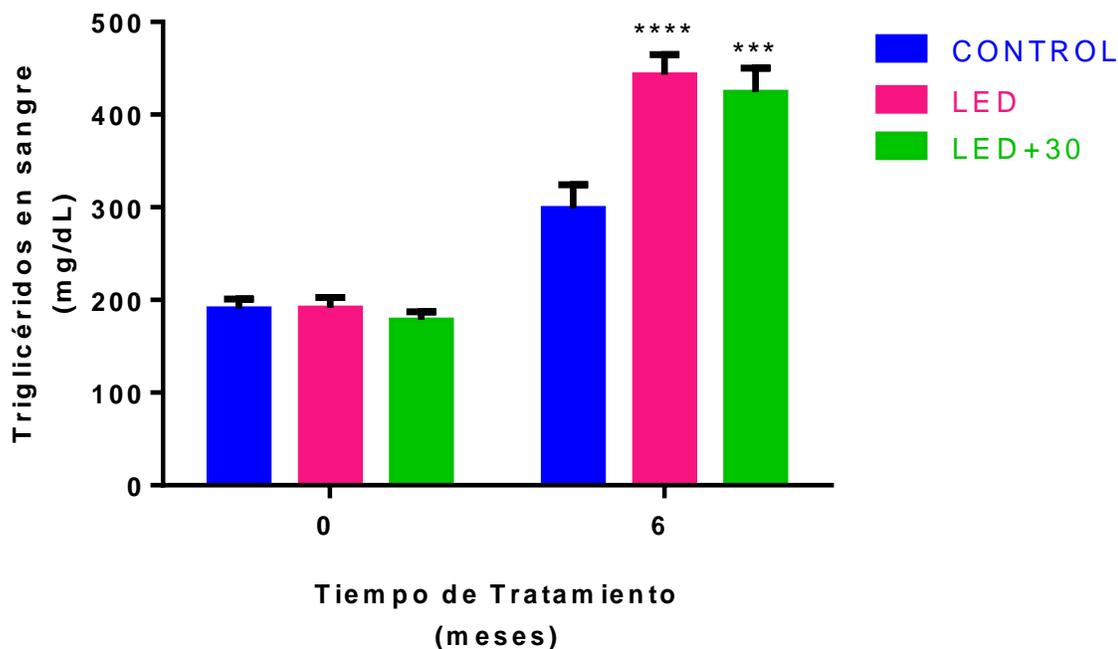


Figura 22. Niveles plasmáticos de triglicéridos. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos vías y prueba *posthoc* Bonferroni. (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , diferencias con respecto al control).

Pruebas conductuales de memoria espacial.

Se evaluó la memoria espacial en el laberinto elevado de 8 brazos para determinar la capacidad de los individuos de aprender y retener información, los resultados de estas pruebas se muestran en la Figura 13. El proceso consta de tres etapas, mismas que se realizaron en lapsos diferentes durante el desarrollo experimental y se evaluó el tiempo que tardó la rata en encontrar los bebederos colocados en los brazos 4 y 6. Como indicio visual a la entrada de 5 brazos del laberinto se colocaron objetos cilíndricos de diferentes tamaños y colores. La fase de habituación se llevó a cabo en el primer mes de tratamiento; en la gráfica se puede apreciar que en esta etapa no existen diferencias significativas entre los grupos evaluados.

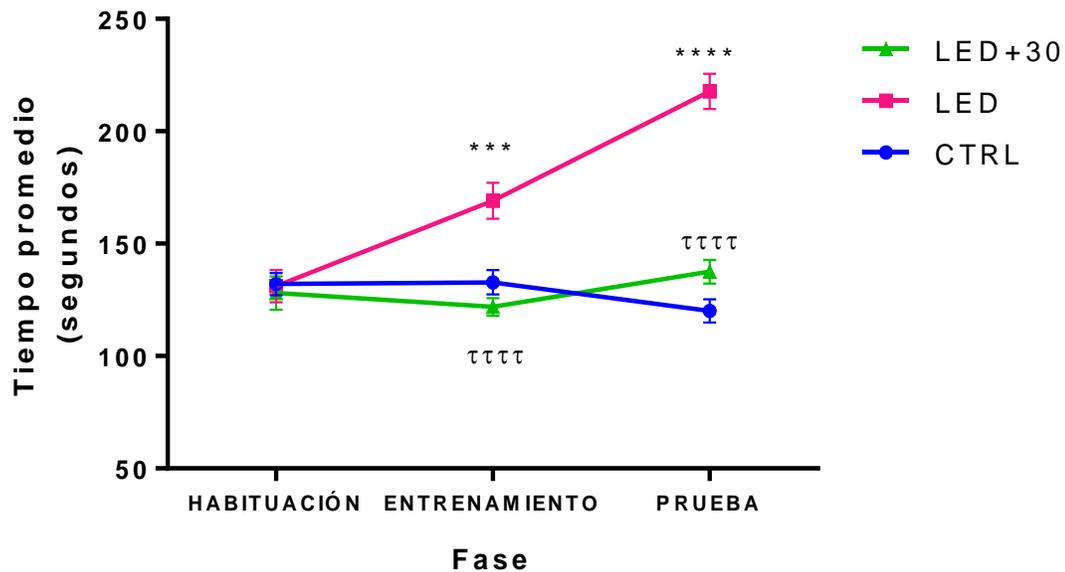


Figura 13. Test de memoria espacial en laberinto elevado de 8 brazos. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos vías y prueba *posthoc* Bonferroni. (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , diferencias con respecto al control; tttt  $p < 0.0001$ \*\*\*\*, diferencia entre grupos LED y LED+30).

Posteriormente, en el tercer mes de tratamiento, se realizó la fase de entrenamiento en la que se evalúa la capacidad de los sujetos de retener la información antes aprendida. Los resultados muestran que hubo un aumento significativo en el tiempo que tardaron los individuos del grupo LED (\*\*\*) en encontrar la recompensa, respecto al grupo Control cuyo, comportamiento es estadísticamente igual al de los sujetos LED+ 30. Al comparar los grupos LED y LED +30, se observó que éste último requirió un tiempo menor que el grupo LED para hallar la recompensa, mismo que fue estadísticamente diferente (tttt  $p < 0.0001$ \*\*\*\*).

La fase de prueba se efectuó en la etapa final de tratamiento; en ésta se busca analizar la capacidad de los sujetos de estudio de evocar el recuerdo, recuperación de la información. En esta etapa se presentó la misma conducta; el grupo LED (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) exhibe un incremento en el tiempo que demoran los animales en ubicar la recompensa, en comparación con los individuos Control, los cuales no presentan alteración estadísticamente diferente con el grupo LED+30. Además, en la etapa final del ensayo experimental, los resultados difieren estadísticamente, entre los grupos

LED y LED+30 (tttt  $p < 0.0001$ \*\*\*\*), ya que el segundo invirtió un tiempo menor para encontrar el estímulo.

#### Expresión de receptores dopaminérgicos en tejido de la Corteza Prefrontal (CPF)

Para estudiar la expresión de los receptores D1R y D2R se empleó la técnica de inmunofluorescencia en tejidos criopreservados de la CPF, los resultados obtenidos se muestran en las Figura 14. En la parte superior se observa el blanco donde se puede apreciar que en las condiciones experimentales utilizadas no hay marca de autofluorescencia. Como puede observarse al comparar la imagen del grupo LED respecto al grupo control, hay un aumento en el número de receptores que son expresados en modelo de la enfermedad.

Cuando se analiza la expresión de los D1R entre grupos Control y LED+30 se puede deducir visualmente que no hay cambios relevantes en la expresión entre estos dos grupos. Posteriormente al hacer un contraste entre los grupos LED y LED+30 es evidente, al menos por simple observación que en el grupo que recibió el tratamiento con teobromina [30 mg/L] la expresión de D1Rs se normaliza respecto al grupo control.

Por otra parte los resultados del análisis de la expresión de los D2Rs en la CPF de los grupos estudiados son mostrados en la Figura 15, donde se exponen las imágenes del blanco de las muestras en la sección superior donde se evidencia que no hay marcas de autofluorescencia con las condiciones de bloqueo utilizadas; en la sección inferior se exponen las imágenes de los grupos evaluados. Para cada grupo se presentan los acercamientos de las zonas indicadas con un recuadro a líneas punteadas con el fin de hacer evidentes los cambios observados. Al evaluar las imágenes a 40X se observa que el grupo Control expresa menos D2R que el grupo LED; posteriormente contrastando los grupos Control y LED+30 al mismo aumento se puede sugerir que en el último grupo la expresión de los receptores se ve disminuida; por lo, tanto al comparar éste con el grupo LED es notable que el grupo que no recibió tratamiento aumenta la expresión de D2R.

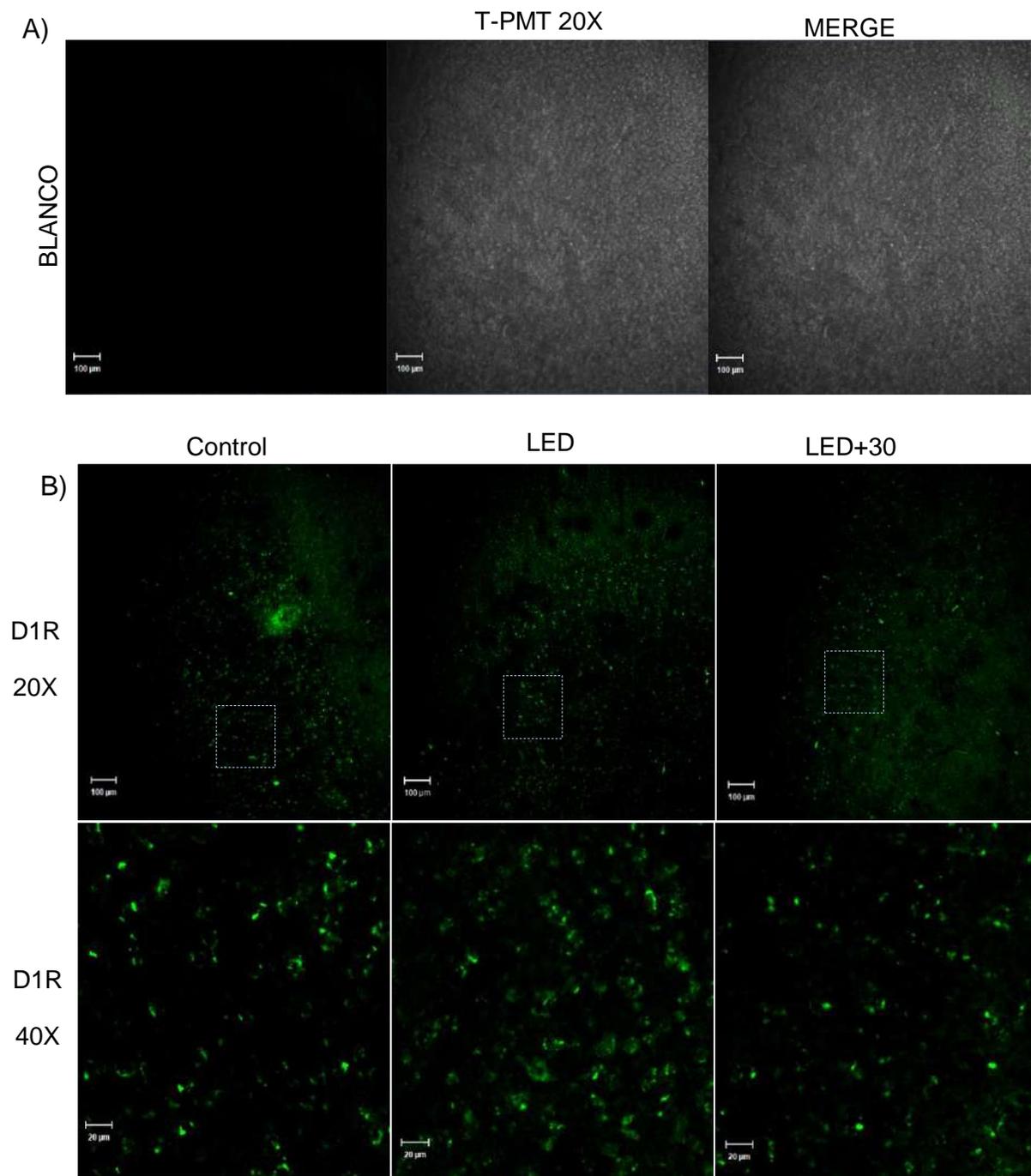


Figura 14. Expresión de receptores dopaminérgicos D1 en tejido de la CPF. A) Blanco de las muestras B) Grupos evaluados. En orden descendiente de izquierda a derecha se muestran las imágenes correspondientes a los grupos Control, LED y LED+30, en la sección inferior se encuentran los respectivos aumentos de las zonas marcadas con un recuadro a líneas punteadas.

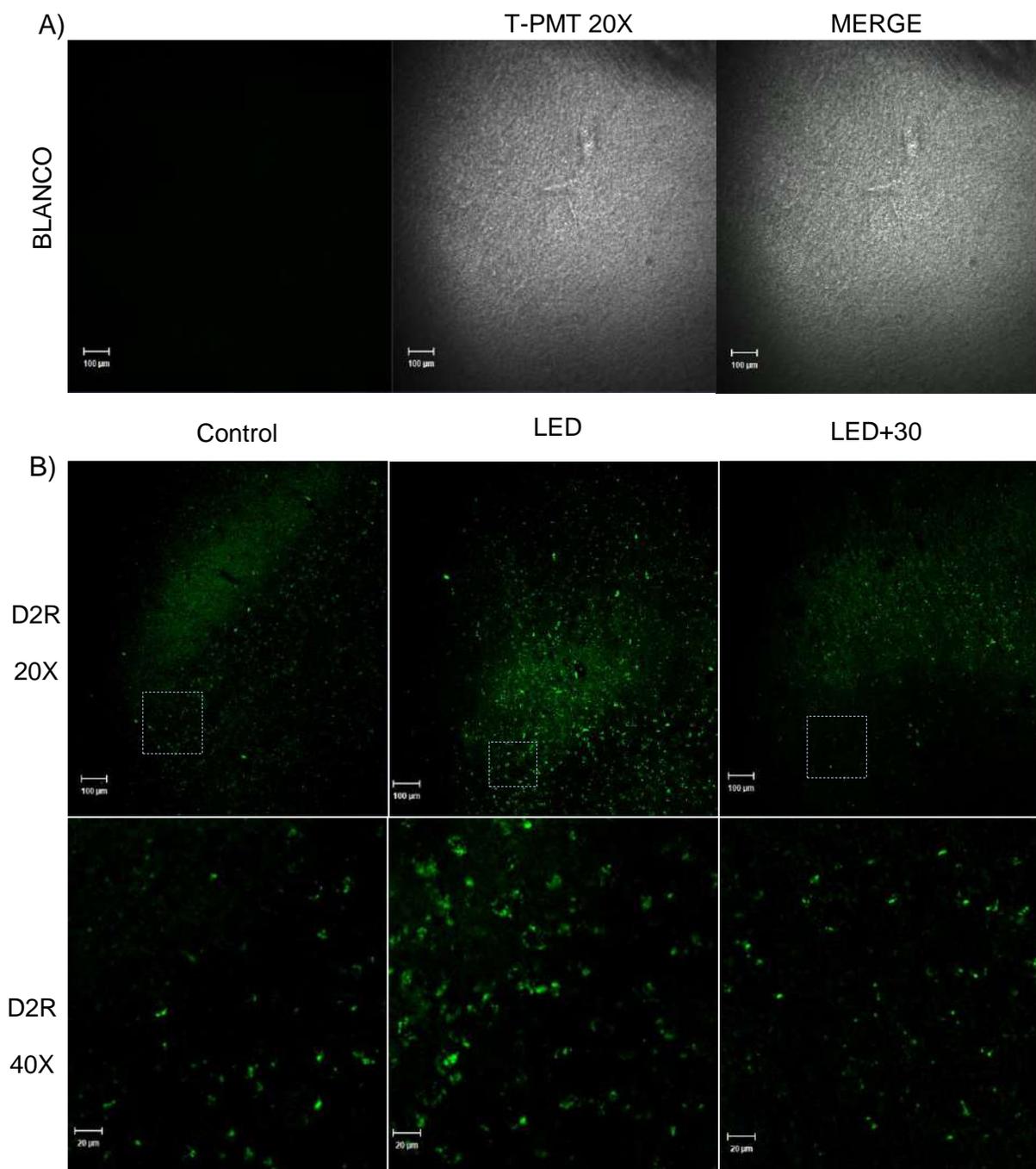


Figura 15. Expresión de receptores dopaminérgicos D2 en tejido de la CPF. A) Blanco de las muestras sección superior. B) Grupos Evaluados. En orden descendiente de izquierda a derecha se muestran las imágenes correspondientes a los grupos Control, LED y LED+30, en la sección inferior se encuentran los respectivos aumentos de las zonas marcadas con un recuadro a líneas punteadas.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se comprobó que la ingesta sostenida, de una dieta a base de manteca de cerdo, cuyos componentes principales son colesterol y ácidos grasos saturados e insaturados (USDA, 2018), permite observar el fenotipo de la EA de tipo tardío, lo cual es congruente con lo reportado por Mendiola-Précoma y col., en 2017. La alta ingesta de lípidos ha sido reportada como un factor relacionado con el desarrollo de EA (Morris y Tangney, 2014; Zhang y col., 2018; Barnard y col, 2014).

Los niveles de colesterol observados en este trabajo difieren de los obtenidos por Mendiola-Precoma y col, 2017, una posibilidad de dicha diferencia puede ser asociada a la sensibilidad de las ratas Wistar, comparadas con las Sprague Dawley, sin embargo, es notorio el incremento de peso y de la concentración de triglicéridos plasmáticos (TgP).

La ganancia de peso corporal puede ser consecuencia del incremento en la ingesta energética por un periodo prolongado, debido al consumo de grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas, que promueve el aumento de tejido adiposo y finalmente, de peso corporal (Hu y col, 2018). El aumento en las concentraciones de TgP puede atribuirse al incremento de la grasa visceral o a la alteración de su sistema de aclaramiento, por hipoactividad de la lipoproteinlipasa (LPL) (Ros y Laguna, 2006); mismo que ha sido detectado antes de un deterioro cognitivo evidente (Castro, 2013).

Los resultados de las pruebas conductuales en el laberinto de 8 brazos indican que en la etapa de habituación no había diferencia entre los grupos; pero en las fases posteriores, de entrenamiento y prueba se observa un aumento gradual de la deficiencia cognitiva. Los resultados de las pruebas conductuales del laberinto de 8 brazos se relacionan con los observados por Soler, 2011 quien encontró que a menores concentraciones de triglicéridos en sangre mejora el rendimiento cognitivo.

Si bien los ácidos grasos en la dieta son necesarios para la absorción adecuada de las vitaminas liposolubles y carotenoides que actúan como compuestos

antioxidantes, estudios que examinan su relación con las capacidades cognitivas, indican que el deterioro se asocia a la ingesta de ácidos grasos saturados (Morris y Tangney, 2014). Los ácidos grasos y el colesterol se encargan de estabilizar la membrana celular y mantener su fluidez, por lo tanto, el aumento de éstos provoca mayor rigidez y disminuye su permeabilidad; comprometiendo así la actividad de las células cerebrales que dependen de su función, al facilitar la entrada de neurotransmisores a través de sus respectivos receptores, determinando así la capacidad de excitabilidad y transmisión nerviosa (Soler, 2011).

El incremento de triglicéridos (Tg) se encuentra directamente relacionado con la deficiencia del proceso cognitivo, pues se ha propuesto que una concentración menor a 100 mg/dL podría evitar las deficiencias cognitivas además de favorecer la pérdida de peso (Banks y col., 2017).

Otra posibilidad del daño cognitivo puede asociarse a que, al incrementar los Tg aumenten las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la formación de radicales libres, los cuales se pueden relacionar con el aumento en los marcadores de estrés oxidativo (Swlomley y col., 2014). Esto promueve el daño a proteínas como la PS1 (Arimon y col., 2015) y la oxidación de lípidos de la superficie e interior celular; además perjudican la integridad de la barrera hematoencefálica, al desencadenar procesos inflamatorios y aumentar su permeabilidad (Morris y Tangney, 2014; Takechi y col., 2013; de Chaves y Narayanaswami, 2008) a trazadores como el 24-hidroxicolesterol (24-OHC), que estimula la síntesis de colesterol cerebral (Saeed y col., 2014); estos eventos favorecen la aparición de la EA y la deposición de A $\beta$  (Arimony col., 2015).

Las deficiencias cognitivas también pueden ser el resultado de la interrupción en la comunicación neuronal, por el aumento y acumulación del 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), principal producto de la peroxidación de triglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados. Éste producto es un efector de radicales libres en presencia de A $\beta$ , que es capaz alterar la función de proteínas mediadoras de la vía amiloidogénica como nincastrin (NCT), y reacciona con grupos tiol, amino y ácidos nucleicos para

formar aductos, lo que provoca cambios en el ADN o alteraciones funcionales en las proteínas (Arimon y col., 2015; Csala y col., 2015).

Por otra parte, se demostró que el consumo de teobromina previene y/o retarda la pérdida de memoria en ratas sometidas a una alta ingesta de grasas; ya que si bien, ésta no influyó en los niveles de colesterol y triglicéridos si evitó el daño cognitivo en los animales; esto es congruente con los resultados publicados por Mendiola-Precoma y colaboradores en 2017.

Es posible que la deficiencia cognitiva esté relacionada con la obesidad, ya que puede aumentar la producción de citocinas y adipocinas, que se asocian a otros factores de riesgo, sobretodo de tipo vascular como hipertensión arterial, hiperinsulinemia, resistencia a la leptina (Banks y col., 2017) y diabetes *mellitus*, condiciones que están vinculadas con la EA (Kang, 2017; Mendiola-Precoma y col., 2016; Llibre, 2014; Soler, 2011; Toledo, 2011). Los cambios cognitivos por el incremento de Tg pueden provocar resistencia a la leptina, hormona secretada por los adipocitos que, de manera normal mejora la movilidad y densidad sináptica por estimulación de la AMP quinasa (Banks y col., 2017; Soler, 2011).

La CPF es la estructura neo-cortical más desarrollada en el cerebro humano, está encargada de funciones ejecutivas, control de la conducta y atención (Flores y Ostrosky-Solís, 2008) e interviene en procesos cognitivos de plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria, a través de D1R, específicamente D1/D5, que son los más expresados en la CPF y que, al ser activados evitan la internalización de receptores AMPA y NMDA en las dendritas del hipocampo (Jürgensen y col., 2011); sin embargo su conectividad se ve afectada en pacientes con EA, ya que es una de las zonas con mayor deposición de A $\beta$  (Vergara y Behrens, 2013).

Por otra parte, las neuronas dopaminérgicas (NeuDA) que se proyectan del área mesocortical a la CPF participan en procesos de la cognición como lo son la memoria de trabajo, razonamiento, planificación, atención y capacidad espacial (Kim y col., 2015) de tal forma que, la disfunción de éste sistema, puede contribuir a la sintomatología de la EA (De Keyser y col., 1990). Las NeuDA que inervan el estriado

intervienen en las funciones de comportamiento, estímulo-recompensa y recompensa-respuesta, durante el proceso de aprendizaje. En roedores las funciones de respuesta al refuerzo positivo y negativo se encuentran reguladas por NeuDA del estriado y del mesencéfalo, respectivamente. Sin embargo, ambos sistemas pueden disminuir su actividad, cuando el estímulo recibido es aversivo o no es el esperado (Ferré y col., 2018); de tal forma que el aumento en la expresión de RDA de ratas con deterioro cognitivo, puede asociarse a que el estímulo recibido fue aversivo y promovió la disminución en la actividad de éstos receptores, posiblemente por disminución en los sitios de afinidad.

El incremento en la expresión de los RDA en ambos casos (RD1 y RD2) no ha sido reportado para EA esporádica en un modelo basado en la ingesta de grasas; sin embargo el aumento en la expresión de D2R en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, concuerda con lo reportado por Labouesse y col., en 2018 donde la sobreexpresión de D2R en el estriado promovió la obesidad en ratas, no por un mayor consumo de alimento, sino por la disminución en el gasto energético y la locomoción los cuales se acompañaron de aumento en los niveles de insulina, triglicéridos y colesterol; con ganancia de peso corporal.

La modulación de los RD1 se puede asociar a niveles bajos de su agonista endógeno en CPF que, de forma normal mejora el rendimiento de la memoria operativa en primates viejos y pacientes que reciben tratamiento antipsicóticos; no obstante, los niveles altos perjudican la memoria. (Kim y col., 2015). Por otra parte, según lo reportado por Mendiola-Precoma y col. en 2017, en un modelo de estudio de EA esporádica, igual al utilizado para este trabajo, los A1R tienden a disminuir; además se sabe que los D1R y A1R también pueden formar complejos y regular los RDA, de tal forma que su baja expresión en EA frena el efecto y permite el aumento de los RDA.

El aumento en la expresión de los RD1 y RD2 en CPF de los tejidos LED, es contradictorio a lo reportado en estudios de cerebros *postmortem* de pacientes con EA; Kumar y Patel en 2007 indicaron que la semicuantificación de los cinco subtipos

de receptores dopaminérgicos en CPF mostró que los receptores RD1 y RD2 disminuyen a causa de la enfermedad; mientras que De Keyser y col. en 1990 publicaron que la concentración total de RD1 no se ve modificada. Los cambios en la expresión de RDA en el modelo de EA difieren también con lo indicado por Romanova y col, en 2018, quienes no encontraron diferencias en la expresión de RDA en ratas con una dieta alta en grasas y carbohidratos.

Posiblemente las diferencias en la expresión de los receptores encontradas aquí con respecto a lo reportado por otros autores, se deban a que los estudios citados fueron realizados en tejido cerebral de pacientes sin características de obesidad o aumento de lípidos, que son características patológicas producto de la ingesta de grasas en el modelo de EA esporádica que utilizamos; y que han sido reportados en trabajos donde se resalta la participación de los lípidos en el desarrollo de la EA (Wood y col., 2015.; Mendiola-Précoma y col.,2017; Romanova, 2018; Labouesse y col., 2018). Por lo tanto y con base en los resultados obtenidos, es importante indagar sobre su relación con la expresión de los RDA. Los RDA, específicamente D1R y D5R, regulan el comportamiento alimenticio, la actividad locomotora y el gasto energético, por lo que pueden favorecer la tendencia a la obesidad: además intervienen en el control de la termogénesis en el tejido adiposo (Labouesse y col., 2018; Hu y col., 2018).

Es posible sugerir que la teobromina actúa como un regulador de la expresión de los RDA a través de sus moléculas blanco, los receptores de adenosina A2A (A2AR), que pueden modular la respuesta de otros receptores, en este caso de dopamina. El estudio en los últimos años del papel de las interacciones alostéricas entre receptores a través de la formación de iso- y heteroreceptores sugiere que pueden tener una función determinante en la plasticidad neuronal ya que, la alteración del equilibrio que hay entre éstos, en enfermedades del SNC por ejemplo, puede conducir a cambios en la estabilidad y disfunción de las conexiones cerebrales, lo que produce deficiencias en el aprendizaje y la memoria, así como en las emociones (Borroto-Escuela y col, 2017).

La adenosina puede regular el sistema dopaminérgico central por la activación del A2AR en el estriado, la zona de mayor concentración de A2AR y D2R del SNC, a través de la formación de un heterodímeros de A2AR y D2R (A2AR-D2R) que junto con la adenilil ciclasa tipo 5 (AC5) forman un tetrámero, que les permite interactuar alostéricamente de tal forma que la respuesta final está determinada por el receptor que haya sido activado (Ferré y col., 2018). En éste caso la unión de la teobromina al A2AR en el (A2AR-D2R) representaría un aumento en la actividad neuronal mediada por la vía AC5/PKA, pero la activación del RD2, provocaría su decaimiento por la acción de PLC/PP2B, interviniendo con la cascada de señalización de A2AR.

Es posible que la teobromina regule la internalización de los complejos proteicos al unirse al RA y reclutar arrestinas que promueven la internalización del complejo. (Ferré y col., 2018); ya que la unión de un agonista o antagonista de los RA2A a la estructura heterotetramérica del complejo A2AR-D2R promueve la modulación alostérica del ligando activador del D2R (Ferré y col., 2018), de tal forma que independientemente del tipo de ligando que se una al RA, éste es capaz de influir en la actividad del RDA. Es posible especular que lo mismo sucedería con los D1R, en los complejos A1R-D1R, de tal manera que su función puede ser regulada por los RA.

El potencial terapéutico de las metilxantinas, antagonistas de los RA, como la teobromina y la cafeína, ejerce un efecto neuroprotector en EA a través de un mecanismo que implica la unión de la molécula antagonista al heterotretámero RA-RDA. Con base en ello y en los resultados obtenidos es posible sugerir que la unión de la teobromina a complejos A2AR-D2R puede modular negativamente la afinidad de cualquier ligando ortostérico al D2R de tal forma que bloquea su señalización aguas abajo.

## 7. CONCLUSIONES

- Se logró inducir la enfermedad de Alzheimer esporádica por una dieta a base de manteca de cerdo al 33 % en ratas Wistar
- La expresión de receptores de dopamina D1 y D2 aumenta en la corteza prefrontal del modelo propuesto para la Enfermedad de Alzheimer esporádico
- La teobromina a 30 mg/L modula la expresión de receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la corteza prefrontal de ratas con enfermedad de Alzheimer esporádica, y ejerce un efecto neuroprotector al prevenir el deterioro cognitivo.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Allegrí FR.** Lationamérica un camino hacia la prevención del deterioro cognitivo. Rev colomb cienc soc **2016**;7:307-310.

**Alvarado CC,** Pineda AI, Gómez JF. Pérdida de peso en el anciano con Enfermedad de Alzheimer. Rev. Asoc. Colomb. Gerontol. Geriatr **2013**;27(1):1775-1783.

**Alzheimer's** Association. Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement **2018**;14(3):367-429.

**Ángeles-Abanto NB** y Escobar-Fernández M. Prevalencia de las demencias en una zona básica de salud de León. Med Gen y Fam **2015**;4:5-9.

**Arango JC,** Fernández S. Depresión en la enfermedad de Alzheimer. Revista Latinoamericana de Psicología **2003**;35(1):41-54.

**Arimon M,** Takeda S, L. Post K, Svirsky S, T. Hyman B y Berezovska O. Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology. Neurobiol Dis **2015**;84:109-119.

**Arteaga A.** Overweight and obesity as an universal health problem. Rev Med Clin Condes **2012**;23(2):145-153.

**Banks WA,** Farr SA, Salameh TS, Niehoff ML, Rhea EM, Morley JE, et al. Triglycerides cross the blood-brain barrier and induce central leptin and insulin receptor resistance. International Journal of Obesity **2017**;42(3):391-397.

**Barnard ND,** Bunner AE, Agarwal U. Saturated and trans fats dementia: a systematic review. Neurobiology of Aging **2014**;35(2):S65-S73.

**Baztán JJ,** Pérez del Molino J, Alarcón T, San Cristobal E, Izquierdo G y Manzarbeitia J. Índice de Barthel: Instrumento válido para la valoración funcional de pacientes con enfermedad cerebrovascular. Revista Española de Geriatria y Gerontología **1993**;28:32-40.

**Bird TD,** Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, et al. Alzheimer disease overview. Gene Reviews **2015**;2015:1-6.

**Csala M,** Kardon T, Legeza B, Lizak B, Mandl J, Margittai E, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. Biochimica Biophysica Acta **2015**;1852(5):826-838.

**Danysz W** y **Parsons CG**. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br J Pharmacol* **2012**;167(2):324-352.

**De Chaves EP**, **Narayanaswami V**. Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. *Future Lipidol* **2008**;3(5):505-530.

**De Keyser J**, **Ebinger G** y **Vauquelin G**. The abnormality of the D1-dopamine receptor in the frontal cortex points to a functional alteration of the cortical cell membranes in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* **1990**;47(7):761-763.

**Díaz SS**. Modulación de las vías de señalización de adenosina, glutamato y dopamina en Esquizofrenia y Alzheimer, posibles interacciones. Universidad de Castilla- la Mancha, España **2014**;44-45.

**Eskelinen MH**, **Ngandu T**, **Tuomilehto J**, **Soininen H**, **Kivipelto M**. Midlife healthy-diet index and late-life dementia and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra* **2011**;1:103–112.

**Ferré S**, **Bonaventura J**, **Zhu W**, **Hatcher-Solis C**, **Taura J**, **Quiroz C**, et al. Essential control of the function of the striatopallidal neuron by pre-coupled complexes of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramers and adenylyl cyclase. *Front Pharmacol* **2018**;9(243):1-18.

**Flaten V**, **Laurent C**, **Coelho JE**, **Sandau U**, **Batalha Vânia L**, **Burnouf S** et al. From epidemiology to pathophysiology: What about caffeine in Alzheimer's disease?. *Biochem Soc Trans* **2014**;42(2):587–592.

**Flores J** y **Ostrosky-Solís F**. Neuropsicología de lóbulos frontales, funciones ejecutivas y conducta humana. *Revista Neuropsicología, neuropsiquiatría y Neurociencias* **2008**;8(1):47-58.

**Gage GJ**, **Kipke DR**, **Shain W**. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J. Vis Exp* **2012**;65:1-9.

**Gandía L**, **Álvarez RM**, **Hernández-Guijo JM**, **González-Rubio JM**, **Pascual R**, **Rojo J**, et al. Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Neurol* **2006**;42(8):471-477.

**García T, Jay D.** Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer. *Gaceta Médica de México* **2002**;140(3):328-334.

**García-Ardura A.** Enfermos de Alzheimer: la sobrecarga del cuidador principal de enfermos de Alzheimer. Centro Internaiconal de Postgrado, Universidad de Oviedo. **2016**;7-40.

**García-Rodríguez J,** Neuroprotección en enfermedades neuro y heredo degenerativas. OmniaScience, **2014**.

**Garzón-Patterson M, Pascual-Costa Y.** Síntomas psicológicos y conductuales en pacientes con enfermedad de Alzheimer leve y moderada. *InfoMed* **2015**;1-17.

**Gutiérrez-Robledo LM.** México primer país en inicial capacitación para la atención de Alzheimer y demencias. *INGER [serie en internet]* **2016** [consultado 2016 septiembre 6]; [aprox. 2 pp]. Disponible en:

<https://www.gob.mx/salud/prensa/mexico-primerpais-en-iniciar-capacitacion-para-la-atencion-de-alzheimer-y-demencias>

**Guzmán-Vélez E, Warren DE, Feinstein JS, Bruss J, Tranel D.** Dissociable contributions of amygdala and hippocampus to emotion and memory in patients with Alzheimer's disease. *Hippocampus* **2016**;26(6):727-738.

**Hao JR, Sun N, Lei L, Li XY, Yao B, Sun K, et al.** L-Stepholidine rescues memory deficit and synaptic plasticity in models of Alzheimer's disease via activating dopamine D1 receptor/PKA signaling pathway. *Cell Death Dis* **2015**;6:1-12.

**Hu S, Wang L, Yang D, Li L, Togo J, Wu Y, et al.** Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. *Cell Metab* **2018**;4;28(3):415-431.

**Johnson IM, Prakash H, Prathiba J, Ragjunathan R, Malathi R.** Spectral analysis of naturally occurring methylxanthines (theophylline, theobromine and caffeine) binding with DNA. *Plos One* **2012**;7(12):1-11.

**Jordan J.** Apoptosis; muerte celular programada. *Bioquímica.* **2003**;22(6):100-106.

**Jürgensen S, Antonio LL, Mussi GE, Brito-Moreira J, Bomfim TR, De Felice FG, et al.** Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid-beta oligomers. *J Biol Chem* **2011**;286(5):3270-3276.

**Kim** YC, Alberico SL, Emmons E, Narayanan NS. New therapeutic strategies targeting D1-type dopamine receptors for neuropsychiatric disease. *Front Biol (Beijing)* **2015**;10(3):230-238.

**Knopman** DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2001**;56(9):1143-53.

**Kumar** U y Patel SC. Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* **2007**;1131(1):187-196.

**Labouesse** MA, Sartori AM, Weinmann O, Simpson EH, Kellendonk C, Weber-Stadlbauer U. Striatal dopamine 2 receptor upregulation during development predisposes to diet-induced obesity by reducing energy output in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**;115(41):10493-10498.

**Llibre** JR, Gutiérrez RF. Dementias and Alzheimer's disease in Latin America and the Caribbean. *Rev. Cubana de Salud Pública* **2014**;40(3):378-387.

**López-Locanto** O. Pharmacological therapy of Alzheimer's disease and other dementias. *Prensa Médica Lationamericana* **2015**;1:61-67.

**Walker** JM y Harrison E. Shared neuropathological characteristics of obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Impacts on cognitive decline. *Nutrients* **2015**;7(9):7332-7357.

**Maron** BA, Loscalzo J. "The treatment of hyperhomocysteinemia" *Annual Review of Medicine* **2009**;60:39–54.

**Martínez-Pinilla** E, Oñatibia-Astibia O, Franco R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology* **2015**;30(6): 1-5.

**McComick** VA, Wheeler JM, Guthrie CR, Liacko NF, Kraemer BC. Dopamine D2 receptor antagonism suppresses tau aggregation and neurotoxicity. *Biol Psychiatry* **2013**;73(5):464-71.

**Mendiola-Precoma** J, Berumen LC, Padilla K, Garcia AG. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *BioMed Research International* **2016**;2016:1-18.

**Mendiola-Precoma** J, Padilla K, Rodríguez-Cruz A, Berumen LC, Miledi R, García Alcocer G. Theobromine-induced changes in A1 purinergic receptor gene expression and distribution in a rat brain Alzheimer's disease model. *J Alzheimer Dis.* **2017**;55(3):1273-1283.

**Montes** A, Guevara HB, Hoffman I. Objetivos terapéuticos para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer. *Informe Médico* **2013**;15 (4):145-153.

**Moratalla** R. Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos* **2008**;10(3):201-207.

**Moreno** M. Definition and classification of obesity. *Rev Med Clin Condes* **2012**;23(2):124-128.

**Moreno-Cervantes** CA, Mimenza-Alvarado AJ, Aguilar-Navarro SG, Alvarado-Ávila PE, Gutiérrez-Gutiérrez L, Juárez-Arellano S, et al. Factors associated with mixed dementia vs Alzheimer disease in elderly Mexican adults. *Neurología.* **2016**;32(5):309-315.

**Morris** M y C. Tangney C. 2014. Dietary fat composition and dementia risk. *Neurobiol Aging* **2014**;35(2):S59-S64. .

**OMS.** Demencia. [serie en internet] **2016** [consultado 2016 noviembre 16]; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>

**Peña-Casanova** J. Enfermedad de Alzheimer del diagnóstico a la terapia: conceptos y hechos. Barcelona: Fundación La Caixa, **1999**;9-32.

**Rojas** M y Martínez T. Peroxidación de Lípidos y sus efectos sobre la salud. *Lípidos y Salud Cenipalma* **2010**;10(3):1-8.

**Romanova** IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO. The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic pomc-neurons of normal and obese rodents. *Neurochem Res* **2018**;43(4):821-837.

**Ros** E, C. Laguna J. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol* **2006**;6:52D-61D.

**Rubio-Perez** JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific World Journal* **2012**;2012:756-357.

**Rugeles-Castañeda** A. Alzheimer: una mirada neurofisiológica y patológica de la enfermedad ¿dónde se origina la enfermedad? *Universidad la Sabana* **2006**;1:1-44.

**Saeed** AA, Genové G, Li T, Lütjohann D, Olin M, Mast N, et al. Effects of a disrupted blood-brain barrier on cholesterol homeostasis in the brain. *J Biol Chem.* **2014**;289(34):23712-23722.

**Sánchez** CD, Serotonina en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neuro Psiquiatría* **1996**;59:195-200.

**Sandoval-Ávila** S, Díaz NF, Gómez-Pinedo U, Canales-Aguirre AA, Gutiérrez-Mercado YK, Padilla-Camberos E, et al. Neuroprotective effects of phytochemicals on dopaminergic neuron cultures. *Neurología* **2016**;S0213:1-11.

**Soler** C. Dislipidemia y demencia. Alzheimer. *Real Invest Demenc.* **2011**;49:33-39.

**Soto- Caro** F, Saavedra MA. Variability of food motivation effects on the strategies developed by rats in the radial maze. *Revista de Psicología de la Universidad de Chile* **2005**;14(1):61-71.

**Sumner** I, Edwards R, Asuni A y Teeling L. Antibody engineering for optimized immunotherapy in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci* **2018**;12(254):1-12.

**Swomley** AM, Förster S, Keeney JT, Triplett J, Zhang Z, Sultana R, et al. Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta* **2014**;1842(8):1248-1257.

**Takechi** R, Pallegage-Gamarallage MM, Lam V, Giles C y Mamo JC. Nutraceutical agents with anti-inflammatory properties prevent dietary saturated-fat induced disturbances in blood-brain barrier function in wild-type mice. *Journal of Neuroinflammation* **2013**;10(73):1-12.

**Testa** G, Staurenghi E, Zerbinati C, Gargiulo S, Iuliano L, Giaccone G, et al. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: their involvement in neuroinflammation. *Redox Biology* **2016**;10 (2016):24-33.

**Toledo** JA. Epidemiología descriptiva y analítica de la enfermedad de Alzheimer. *Alzheimer. Real Invest Demenc* **2011**;47:16-23.

**Travassos** M, Santana I, Balderas I, Tsolaki M, Gkatzima O, Sermin G, et al. Does caffeine consumption modify cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$  levels in patients with Alzheimer's disease?. *J Alzheimers Dis* **2015**;47(4):1069-1078.

**Tuneu L**, Rojas MM, Sardans E, Paredes A, Gaona. Guía de seguimiento farmacoterapéutico de los pacientes con Alzheimer. Barcelona: Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica **2005**;1-64.

**Vélez-Valle A** y Luna-Cortés AD. Correlatos neuroanatómicos y el déficit lingüístico en la enfermedad de Alzheimer: diagnóstico temprano. Psicología **2015**;1:21-38.

**Vergara F** y Behrens M. Default mode network and Alzheimer's disease. Rev Med Chil **2013**;141(3):375-380.

**Villarreal A**, Gómez LA, Grajales S, Arrue R, Carrillo-Pujol G, Ferro F, et al. La aplicación de biomarcadores a la búsqueda de nuevas farmacoterapias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En Rodríguez, J C. Ed. Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. Barcelona, España: OmniaScience **2014**;79-120.

**Walker JM** y Harrison FE. Shared neuropathological characteristics of obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Impacts on cognitive decline. Nutrients **2015**;7(9):7332-7357.

**Wendosell F**. Mecanismos moleculares de la enfermedad de Alzheimer: Causas genéticas y esporádicas. En García Rodríguez, J C. Ed.. Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. Barcelona, España: OmniaScience; **2014**;33-52.

**Wood WG**, Li L, E. Müller W y P. Eckert G. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer disease: A debatable hypothesis. J Neurochem **2014**;129(4):559–572.

**Zhang X**, Lv C, An Y, Liu Q, Rong H, Tao L, et al. Increased levels of 27-hydroxycholesterol induced by dietary cholesterol in brain contribute to learning and memory impairment in rats. Mol Nutr Food Res **2018**;62(3):1-29.

## 9. ANEXOS

Anexo A. Dictamen de aprobación de del proyecto de investigación por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Comité de Bioética

Querétaro, Qro, 26 Octubre 2016.

**JESÚS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**  
**PRESENTE**

**Estimado: JESÚS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA**

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Titulo	Resolución
“Mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector de teobromina en un modelo murino de enfermedad de alzheimer de tipo esporádico” (63FCN2016).	<b>Aprobado</b>

Sin más por el momento quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente

  
Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Comité de Bioética  
Facultad de Ciencias Naturales