

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL EFECTO
NEUROPROTECTOR DE TEOBROMINA EN UN MODELO
MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO
ESPORÁDICO”.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

JESUS CARLOS MENDIOLA PRÉCOMA

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2019

CENTRO UNIVERSITARIO



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

“Mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector de teobromina
en un modelo murino de Enfermedad de Alzheimer de tipo
esporádico”.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

M. en C. Jesús Carlos Mendiola Précoma

Dirigido por

Dra. María Guadalupe García Alcocer

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Presidente

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Secretario

Dra. María Rosa Ávila Costa
Vocal

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre, 2019
México

Para mi familia, por siempre estar conmigo y por haberme forjado como la persona que soy.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de la beca de doctorado.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría de la Universidad Autónoma de Querétaro (FOPER) por el apoyo económico brindado a este proyecto (FOPER-2018).

A mi familia por siempre apoyarme en mis decisiones, por ser el pilar más fuerte de mi vida y por brindarme todo el cariño, por estar al tanto de mis avances en mi proyecto, y por siempre recibirme con los brazos abiertos.

A mi directora de tesis, Dra. María Guadalupe García Alcocer, por creer en mí, por ser mi mentor académico, por abrirme las puertas del laboratorio y por brindarme una segunda casa dentro de él.

A la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, por brindarme todo su apoyo académico y profesional, por ser mi guía, mi tutora, por escucharme cada que yo lo necesitaba.

A mis sinodales, Dra. María Rosa, Dr. Moustapha y Dr. Juan Carlos, por el apoyo académico y personal, por revisarme la tesis y por darme sus sabios consejos en cada tutorial.

A Ronna por este tiempo de aprendizaje que me brindaste. Gracias por ser el mayor apoyo cuando más lo necesité, por hacerme creer y confiar en mí; por mostrarme que podía llegar muy alto y por siempre compartir conmigo alegrías y tristezas.

A César, Jessy, Arely y Carlos, por brindarme su amistad siempre que lo necesité y por sus sabios consejos tan acertados siempre; por sacarme siempre una sonrisa, y por las pláticas que me motivaron a construirme como mejor persona.

A mis amigos de Alfredo, Marianita, Ale, Nabi, Irasema, Karlita, Uriel y Eli, por seguir estando ahí en las buenas y en las malas, a pesar de las malas rachas que hemos tenido.

A mis roomies Jessy y Sandy, por hacerme sentir siempre en casa, por las convivencias y pláticas de siempre.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 La Enfermedad de Alzheimer	2
2.1.1 Patogénesis de la EA	3
2.1.1.1 Hipótesis de la Cascada amiloide	4
2.1.1.2 Hipótesis de tau	6
2.1.2 Epidemiología de la EA	8
2.1.3 Diagnóstico de la EA	10
2.1.4 Clasificación de la EA	11
2.1.4.1 Enfermedad de Alzheimer familiar (EAf)	13
2.1.4.1.1 Proteína Precursora Amiloide	13
2.1.4.1.2 α -secretasa	15
2.1.4.1.3 β -secretasa	15
2.1.4.1.4 Presenilinas	18
2.1.4.2 Enfermedad de Alzheimer esporádica (EAs)	19
2.1.4.2.1 Factores de riesgo de la EAs	20
2.1.4.2.1.1 Apolipoproteina E (ApoE)	21
2.1.4.2.1.2 Hipercolesterolemia	23
2.1.4.2.1.3 Hipertensión	25
2.1.4.2.1.4 Diabetes mellitus tipo 2	26
2.1.4.1.2 Efectos de los factores de riesgo de la EAs en la neurodegeneración	29

2.1.4.2.2.1	Estrés oxidativo	29
2.1.4.2.2.2	Daño mitocondrial	32
2.1.4.2.2.3	Neuroinflamación	35
2.1.4.2.2.4	Daño de la función sináptica	40
2.1.4.2.2.4.1	Receptores a glutamato	41
2.1.4.2.2.4.1.1	mGluR5	45
2.1.4.2.2.4.1.2	Excitotoxicidad	46
2.1.5	Tratamientos actuales de la EA	47
2.1.5.1	Moléculas propuestas para el tratamiento de la EA	49
2.1.5.1.1	Cafeína	49
2.1.5.1.2	Teobromina	50
3.	JUSTIFICACIÓN	53
4.	HIPÓTESIS	55
5.	OBJETIVOS	56
5.1	General	56
5.2	Específicos	56
6.	METODOLOGÍA	57
6.1	Equipos	57
6.2	Material	57
6.3	Reactivos	57
6.4	Animales y tratamiento	58
6.5	Pruebas cognitivas y de memoria	58
6.6	Medición de niveles de colesterol y triglicéridos en sangre	60
6.7	Inmunohistoquímica	61
6.7.1	Fijación de tejidos	61
6.7.2	Crioprotección de tejidos	61

6.7.3 Cortes de tejido	61
6.7.4 Inmunofluorescencia	61
6.8 Semicuantificación de APP, α -, β - y γ -secretasas, péptido y placas A β , proteína tau y proteína p-tau (Ser-262) por <i>Western Blot</i>	62
6.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido	62
6.8.2 Cuantificación de proteína	63
6.8.3 Electroforesis SDS-PAGE	64
6.8.4 <i>Western Blot</i>	64
6.8.5 Detección y revelado	65
6.9 Cuantificación de los niveles de IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- α en el encéfalo mediante ELISA	66
6.10 Docking molecular	66
6.11 Análisis estadístico	66
7. RESULTADOS	67
8. DISCUSIÓN	82
9. CONCLUSIONES	93
10. REFERENCIAS	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Criterios de demencia de acuerdo al DMS-IV.	2
2	Hipótesis de la cascada amiloide.	5
3	Criterios para el diagnóstico de EA de acuerdo al DSM-IV.	12
4	Grupo de proteínas pertenecientes a las tres secretasas.	14
5	Clasificación de los receptores a glutamato metabotrópicos.	43
6	Anticuerpos que serán utilizados para la inmunofluorescencia.	62
7	Preparación de curva de calibración para la cuantificación de proteínas.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Porcentaje de distintas causas de demencia.	3
2	Estructura del dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau con sitios de fosforilación.	7
3	Número de personas con demencia en el mundo (en millones) con alto, medio y bajo ingreso en el año 2015 y la perspectiva de casos a futuro.	9
4	Vías amiloidogénica y no amiloidogénica para la generación de péptidos A β en neuronas.	14
5	Estructura de BACE1.	17
6	Diagrama de APP y la producción de A β .	19
7	Variantes raras y comunes que contribuyen al riesgo de la EAs obtenidos mediante estudios de asociación del genoma completo.	20
8	Vías de síntesis de colesterol.	25
9	Esquema de la intersección de la vía de rapamicina entre la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) y la Enfermedad de Alzheimer (EA).	28
10	Representación de la vía común entre la disfunción de la señal de insulina en la EA y diabetes mellitus de la cascada inflamatoria.	29
11	Mecanismos de estrés oxidativo en la EA.	31
12	Múltiples procesos patogénicos que contribuyen a la disfunción mitocondrial.	35
13	Mayores estímulos extracelulares y rutas de señalización intracelular que conducen a la reactividad de astrocitos en enfermedades neurodegenerativas.	39

14	Sinapsis excitatoria típica a través de glutamato y sus diferentes tipos de receptores.	42
15	Esquema del complejo heterotrimérico de los receptores de adenosina dependientes de concentración para la modulación o daño del sistema glutamatérgico.	44
16	Variación del peso de los animales a través del tiempo.	68
17	Niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos.	69
18	Tiempo promedio en el laberinto elevado de 8 brazos.	70
19	Distintos parámetros evaluados en el laberinto elevado de 8 brazos.	72
20	Índice de reconocimiento de objeto nuevo.	73
21	Blancos de la inmunofluorescencia.	74
22	Expresión de A β en corteza frontal por inmunofluorescencia.	75
23	Expresión de péptidos y placas A β en corteza frontal por <i>Western Blot</i> .	76
24	Análisis densitométrico de la expresión de péptidos y placas A β .	76
25	Expresión de marcadores patológicos de la EA.	78
26	Expresión de citoquinas en corteza frontal por ELISA.	80
27	Interacciones entre teobromina y A _{2A} R en 2D.	81
28	Interacciones entre teobromina y A _{2A} R en 3D.	81

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia asociada a una neurodegeneración irreversible y progresiva con una prevalencia en 2018 de 50 millones de personas en todo el mundo, además de que se estima que para el 2050 esta población puede incrementar al doble. Ésta enfermedad ha sido caracterizada por la acumulación extracelular del péptido $A\beta$ e intracelular de marañas neurofibrilares generada por la hiperfosforilación de tau, así como la disminución de los niveles de acetilcolina y del flujo sanguíneo cerebral. Estos factores ocasionan la ruptura de la barrera hematoencefálica, estrés oxidativo, daño mitocondrial, neuroinflamación y disfunción sináptica principalmente de tipo glutamatérgica y colinérgica. La obesidad y la hipercolesterolemia son importantes factores de riesgo de la enfermedad. En estudios previos se implementó un modelo animal para la EA a base de dieta enriquecida en ácidos grasos y colesterol. En dicho modelo se observó que la teobromina a una dosis de 30 mg/L previno el deterioro cognitivo y de memoria observado en el modelo así como el incremento en los niveles del péptido $A\beta$ en el encéfalo. La teobromina es un antagonista inespecífico de los receptores de adenosina. Los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} , tienen la capacidad de modular algunos sistemas de neurotransmisión como el glutamatérgico y el colinérgico. Con base a lo anterior, en este trabajo se evaluaron cambios en el aprendizaje y memoria, mediante el ensayo de laberinto elevado de 8 brazos y la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, así como los posibles mecanismos por los cuales la teobromina a 30 mg/L genera efectos benéficos, además de la distribución de los péptidos y placas amiloides en corteza frontal mediante inmunohistoquímica; se semicuantificaron los niveles de APP, α -, β - y γ -secretasas, tau y p-tau (Ser262) mediante *Western Blot*. Se evaluaron los niveles de citocinas pro- y anti-inflamatorias por la técnica de ELISA. Por último, se analizaron las interacciones entre teobromina y $A_{2A}R$ por técnicas computacionales. Los resultados demuestran que la teobromina tiene efecto neuroprotector a través de la regulación de marcadores neuropatológicos, así como neuroinflamatorios.

Palabras Clave: Enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo, daño mitocondrial, disfunción sináptica, neuroinflamación, teobromina.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia associated to irreversible and progressive neurodegeneration with prevalence in 2018 of 50 millions of people worldwide, and is estimated to be doubled by the year 2050. This disease has been characterized by extracellular A β -peptide accumulation and intracellular deposition of neurofibrillar tangles given by tau hyperphosphorylation, as soon as the acetylcholine levels and blood brain flow diminution, causing blood-brain barrier disruption, oxidative stress, mitochondrial damage, neuroinflammation, and synaptic dysfunction mainly glutamatergic and cholinergic. Obesity and hypercholesterolemia are important risk factors of AD. In previous works, it was implemented an AD animal model with fatty acids and cholesterol enriched diet. In this model it was observed that theobromine at doses of 30 mg/L prevent cognitive and memory impairments and the elevation of A β peptide levels observed in the model. Theobromine is an unspecific adenosine receptors antagonist. Adenosine receptors like A₁ and A_{2A} has the capacity to modulate some neurotransmission systems like glutamatergic and cholinergic. The purpose of this study is to assess the memory and cognitive function by 8-arm radial maze and novel object recognition tests, in addition to the distribution of peptides and amyloid plaques in frontal cortex by immunohistochemistry; the APP, α -, β - and γ -secretases, tau and p-tau (Ser262) levels were quantified by *Western Blot*. Pro and anti-inflammatory cytokine levels were evaluated by the ELISA technique. Finally, the interactions between theobromine and A_{2A}R were analyzed by computational techniques. The results show that theobromine has a neuroprotective effect through the regulation of neuropathological markers, as well as neuroinflammatory.

Keywords: Alzheimer's Disease, oxidative stress, mitochondrial damage, synaptic dysfunction, neuroinflammation, theobromine.

1. INTRODUCCIÓN

En nuestra sociedad, el aumento de la calidad de vida es un logro relevante: vivimos más y mejor. Debido a esto, se tiene más tiempo para enfermarse de patologías ligadas a la edad como las demencias. La demencia es una patología neurodegenerativa y con diferentes etiologías que afecta a gran parte de la población mayor de 65 años, con un incremento de prevalencia exponencial conforme aumenta la edad.

El interés terapéutico por la demencia se vuelve evidente, cuando los síndromes neurodegenerativos se presentan, como uno de los problemas sanitarios y sociales más graves; por ello surgen la necesidad y la preocupación de asignar nuevos y mejores tratamientos, tanto desde la vertiente farmacológica como desde la cognitiva y psicosocial. El tratamiento de la demencia continúa siendo una asignatura pendiente, ya que aún se desconoce un remedio eficaz que cure o detenga el deterioro cognoscitivo de las enfermedades neurodegenerativas.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en los adultos mayores y es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible caracterizada por el deterioro cognitivo y de memoria. En el 2018 se estimó una prevalencia de 50 millones de personas en todo el mundo con esta enfermedad, y se pronostica el doble de esta población para 2030 (ADI, 2018).

En la actualidad, la aplicación de terapias no farmacológicas en el tratamiento de la EA, se basa en que los trabajos muestran que pacientes con diagnóstico de EA mejoran funcionalmente de forma significativa tras el tratamiento cognoscitivo que consiste en desarrollar habilidades mentales estimulando la memoria a través de juegos de destreza y habilidades (Mendiola-Precoma *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1. La Enfermedad de Alzheimer

La demencia es un término que describe una gran diversidad de síntomas cognitivos que ocasionan daños en la habilidad de un paciente para llevar a cabo una vida normal (Puzzo *et al.*, 2015). Por definición, la demencia es la pérdida adquirida y persistente de las funciones intelectuales que afecta, al menos, tres de las siguientes esferas: memoria, lenguaje, percepción visuoespacial, personalidad y conocimiento (abstracción, cálculo, función ejecutiva, razonamiento, etc.), como puede observarse en el Cuadro 1 de acuerdo con el Manual de Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Criterios de demencia de acuerdo al DSM-IV

1. Alteraciones en la memoria de corto y largo plazo.
2. Alteraciones en pensamiento abstracto, criterio, otras funciones corticales superiores o cambios en la personalidad.
3. La alteración cognitiva interfiere en grado importante en el trabajo, las actividades sociales o las relaciones interpersonales.
4. Estos cambios cognitivos no se presentan exclusivamente en el contexto del delirio.

Signos típicos de demencia

1. Alteraciones en la memoria.
2. Dificultad para encontrar palabras.
3. Aislamiento súbito o conducta atípica.
4. Empeoramiento de la capacidad para controlar las finanzas personales o para el rendimiento laboral.
5. Cambios en la personalidad o en el estado de ánimo.

Fuente: Ramírez-Díaz *et al.*, 2011.

La capacidad cognitiva que más a menudo se pierde con la demencia es la memoria; 10% de las personas mayores de 70 años y entre 20 y 40% de quienes tienen más de 85 años de edad presentan un trastorno de memoria identificable a nivel clínico. En muchos de los síndromes demenciales aparecen deficiencias neuropsiquiátricas y sociales asociadas, como son depresión, retraimiento, alucinaciones, delirios, agitación, insomnio y desinhibición (Ramírez-Díaz *et al.*,

2011). La Enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia en los adultos mayores. Entre las causas frecuentes de demencia se incluyen la demencia vascular (10-20%), la demencia de cuerpos de Lewy (10-15%) y la demencia frontotemporal (5-15%), entre muchas más (Figura 1).

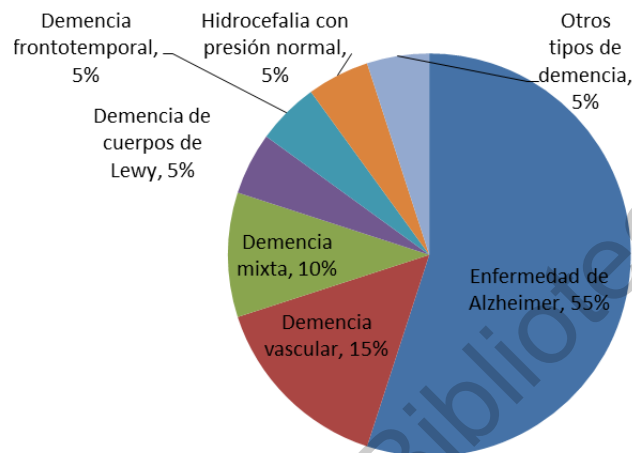


Figura 1. Porcentaje de distintas causas de demencia. Modificado de Ramírez-Díaz *et al.* (2011).

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible que se caracteriza por el deterioro cognitivo, el cual incluye la pérdida de la memoria, además de déficits no cognitivos como lo son las alucinaciones y la depresión (Barage y Sonawane, 2015), debido a la pérdida funcional y la disminución de la cantidad de las neuronas. Los deterioros cognitivos y no cognitivos se deben a la formación extracelular de placas β -amiloides ($A\beta$) e intracelular de marañas neurofibrilares (MNF) asociadas a la hiperfosforilación de tau. Los cambios neuropatológicos de la enfermedad en fase prodrómica han sido observados en regiones temporales mediales (formaciones del hipocampo, giro dentado y corteza entorrinal) y áreas críticas para la memoria episódica a largo plazo (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011).

2.1.1. Patogénesis de la EA

Se han llevado a cabo investigaciones importantes desde la década de 1980, donde se han establecido que las placas están compuestas principalmente de depósitos

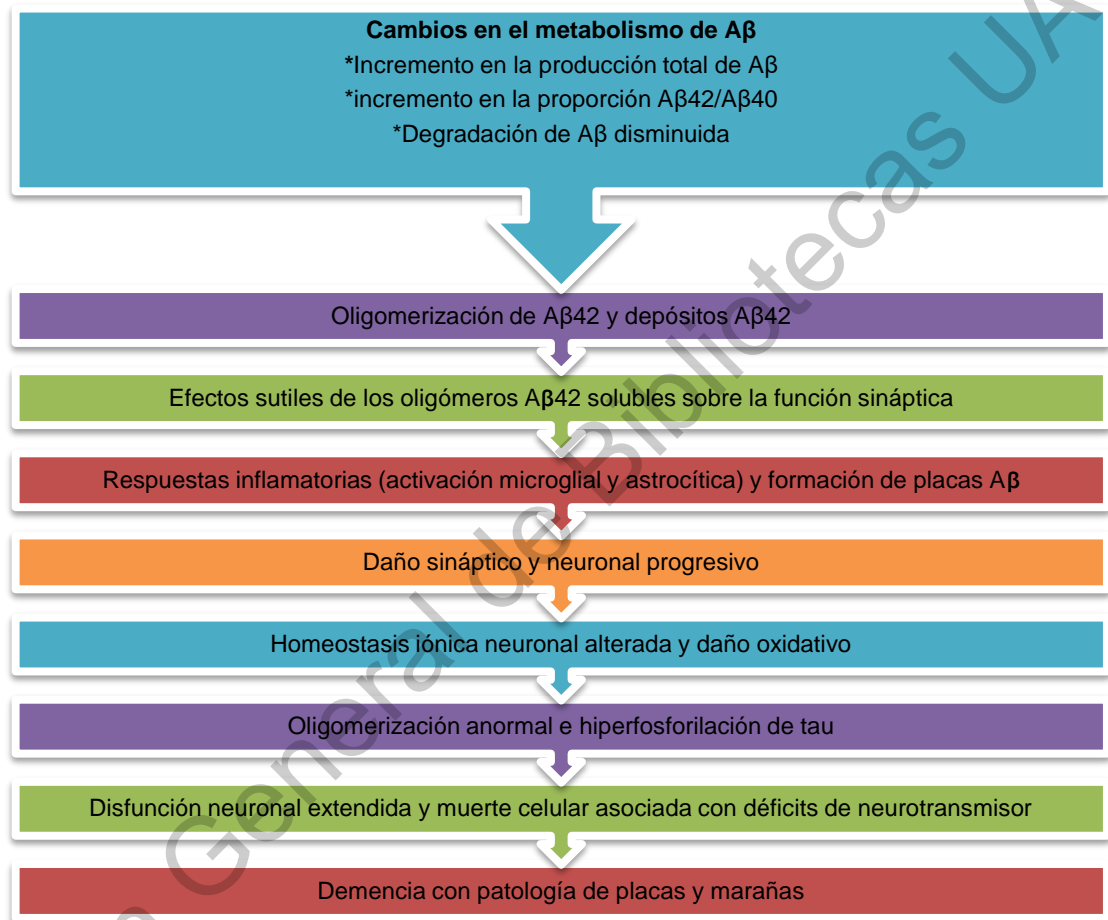
extracelulares de péptidos β -amiloides y redes neurofibrilares que contienen filamentos de proteína tau hiperfosforilada en el interior de neuronas afectadas. La generación de ambos agregados se ha propuesto a través de dos hipótesis: 1) La hipótesis de la Cascada amiloide y 2) La hipótesis de tau (Xiaoning, 2010).

2.1.1.1. Hipótesis de la Cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide postula que la neurodegeneración en la EA es causada por la acumulación anormal de placas $A\beta$ en varias áreas del cerebro (Evin y Weidemann, 2002). De acuerdo a esta hipótesis, la acumulación de placas $A\beta$ actúa como potenciador patológico para la cascada, que incluye el daño neurítico y la formación de las MNF vía proteína tau, llevando a la disfunción neuronal y la muerte celular en la EA. La hipótesis amiloide propuesta a la fecha se muestra en el Cuadro 2. Evidencias genéticas, bioquímicas y patológicas apoyan la hipótesis de la cascada amiloide que postula que la acumulación y agregación de placas $A\beta$ son las causas principales de la EA (Barage y Sonawane, 2015).

Las placas $A\beta$ se componen de un componente proteico principal llamado péptido $A\beta$. Los péptidos $A\beta$ están formados de 39-43 residuos de aminoácidos derivados proteolíticamente de la acción enzimática secuencial de β - y γ -secretasas en la proteína precursora amiloide (APP), la cual se encuentra distribuida ampliamente de manera transmembranal (Sun *et al.*, 2012). La longitud del péptido $A\beta$ varía en el C-terminal de acuerdo con el patrón de escisión de la APP. La isoforma $A\beta_{1-40}$ es el péptido más frecuente, seguido del péptido $A\beta_{1-42}$ que es de naturaleza hidrofóbica y genera agregados a un ritmo mucho más rápido que $A\beta_{1-40}$ (Perl, 2010). Dentro de las placas, los péptidos $A\beta$ tienen una conformación a manera de lámina β y polimeriza en formas estructuralmente distintas incluyendo las de tipo fibrilar, estructuras protofibrilares y oligómeros polimórficos (Kachooei *et al.*, 2012). La deposición de $A\beta$ y la formación difusa de la placa conducen a procesos locales, tales como la activación microglial, la liberación de citoquinas, astrocitosis reactiva y una respuesta inflamatoria de múltiples proteínas. Asimismo, existen múltiples

cambios bioquímicos y estructurales alrededor de los axones, las dendritas y los cuerpos celulares de las neuronas caracterizados por la pérdida de la sinapsis, la pérdida o disminución de la cantidad de neuronas y atrofia cerebral en pacientes con EA (Barage y Sonawane, 2015).



Cuadro 2. Hipótesis de la cascada amiloide. Modificado de Haass y Selkoe, (2007).

De acuerdo a lo que se ha llamado Hipótesis de la Cascada Amiloide, el incremento de fragmentos A β potencializan la formación de placas, la hiperfosforilación de tau para la formación de MNF, la muerte neuronal y la consecuente respuesta inflamatoria (Puzzo *et al.*, 2015). Se conocen tres diferentes estadios de la placa, según el tiempo de la evolución de la enfermedad: 1) placa difusa, 2) placa neurítica, 3) placa consumida. La placa al inicio de la patología causa dificultad mecánica al

paso de neurotransmisores por ocupación del espacio intersináptico (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011).

2.1.1.2. Hipótesis de tau

Las proteínas tau se encuentran principalmente en las neuronas y pertenecen a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) (Xiaoning, 2010). En el cerebro adulto se han identificado seis isoformas de proteínas tau derivadas por *splicing* alternativo del gen localizado en el brazo largo del cromosoma 17. Estas proteínas juegan un papel importante en el ensamblaje de los microtúbulos y la estabilización de la red de microtúbulos neuronales. La característica más llamativa de la proteína tau es la presencia de un dominio de unión a microtúbulos que se compone de tres o cuatro repeticiones muy conservadas de 18 aminoácidos localizados en el carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína media. Este dominio de unión a microtúbulos está implicado en la polimerización y la estabilización de microtúbulos (Barage y Sonawane, 2015) (Figura 2).

La deposición de la proteína tau en agregados insolubles se traduce en una pérdida de la función tau por la cual conduce a la inestabilidad de los microtúbulos promoviendo la neurodegeneración. Se necesitan microtúbulos intactos para el transporte axonal y la función normal de las neuronas; pues se sabe, desde hace mucho tiempo, que la desestabilización de los microtúbulos ocasiona EA (Kalra y Khan, 2015). La fosforilación de la proteína tau está regulada a partir del desarrollo fetal hasta la etapa adulta. La proteína tau en el cerebro inmaduro es fosforilada en seis a ocho sitios presentes en las isoformas más cortas; mientras que, en el cerebro adulto, de dos a tres sitios de fosforilación están presentes en seis isoformas. La capacidad de unión a microtúbulos de la proteína tau se puede regular con eficacia después de la traducción mediante la modulación de la fosforilación de serina o treonina (Barage y Sonawane, 2015).

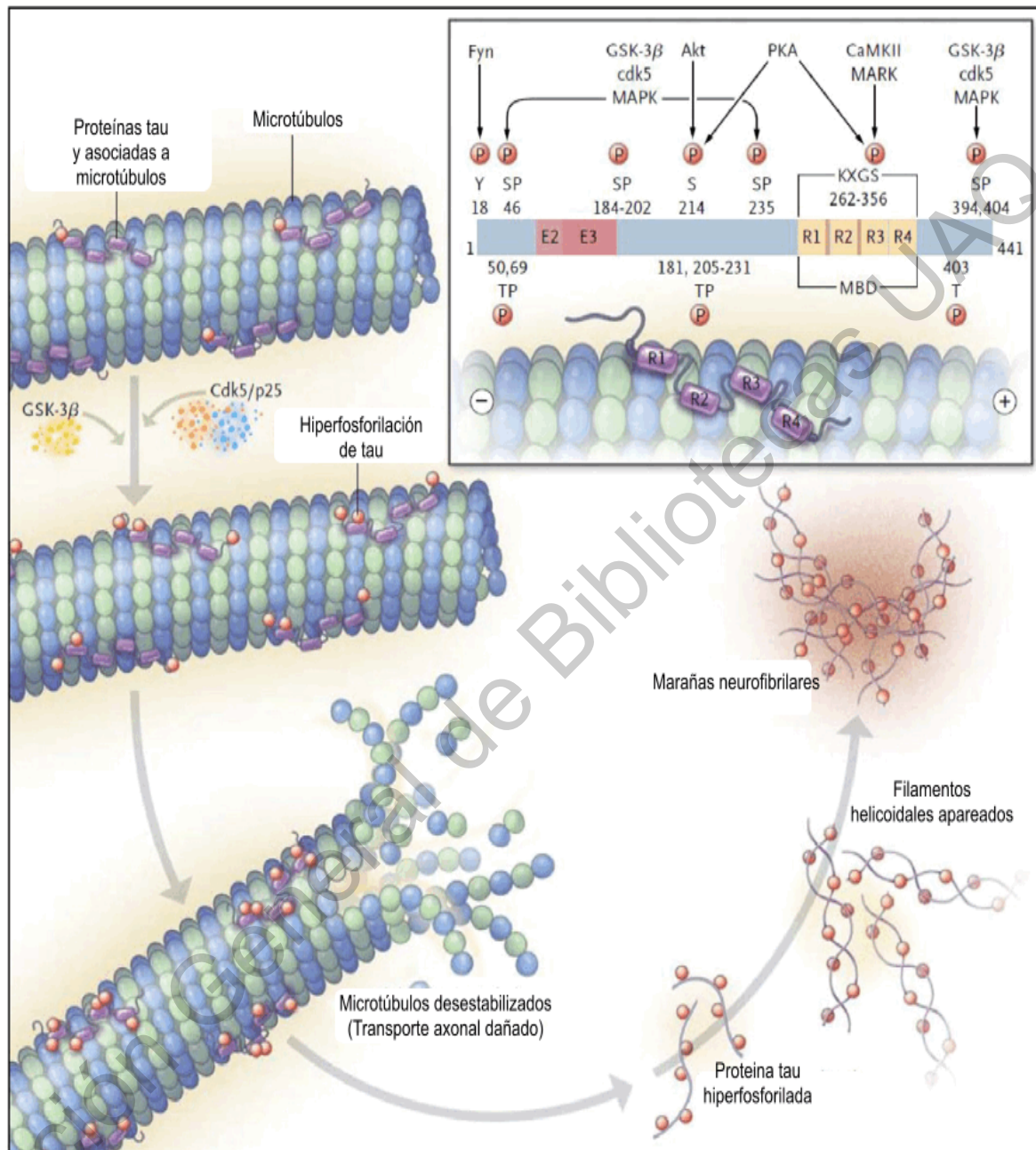


Figura 2. Estructura del dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau con sitios de fosforilación. La hiperfosforilación de tau por la quinasa de la glucógeno sintasa 3β (GSK-3β) o la quinasa dependiente de ciclina (Cdk5) da como resultado desestabilización de los microtúbulos seguido por el desprendimiento de tau y la auto-agregación en filamentos helicoidales apareados. Modificado de Quefurth y LaFerla, (2010).

El dominio de unión a microtúbulos (MBD) de tau consta de cuatro secuencias repetidas (R1-R4) de serina (S) y treonina (T), seguido de prolina (P). Estos aminoácidos son hiperfosforilados por la quinasa de la glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β), la quinasa dependiente de ciclina (cdk5) y su subunidad activadora p25 o proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Del mismo modo, las quinasas dirigidas a los sitios sin prolina tales como Akt, Fyn, la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa 2 calcio-calmodulina (CaMKII) y las quinasas reguladoras de la afinidad de los microtúbulos (MAPK) también están involucrados en la hiperfosforilación de la proteína tau (Figura 2) (Mazanetz y Fischer, 2007).

En condiciones patológicas se ha observado aumento anormal en los niveles de proteínas tau hiperfosforilada en el citosol (Kuret *et al.*, 2005). Las proteínas tau hiperfosforiladas son polimerizadas en filamentos helicoidales apareados (PHF) y filamentos rectos (SF) referidos como ovillos o MNF. La pérdida de la función normal de tau conduce a una alteración patológica en funciones estructurales y reguladoras del citoesqueleto. Estos afectan las funciones celulares normales de las neuronas, tales como el mantenimiento de la morfología apropiada, el transporte axonal, la disfunción sináptica y la neurodegeneración (Roy *et al.*, 2005).

2.1.2. Epidemiología de la EA

De acuerdo a lo publicado en el Informe Mundial sobre el Alzheimer de 2015, se estima que, en el mundo, 46.8 millones de personas viven con demencia y se proyecta que este número se duplicará cada 20 años; alcanzando los 74.7 millones en el 2030 y los 131.5 millones en el 2050 (Figura 3). Estas cifras calculadas recientemente significan aumento de un 12%-13% más de las mencionadas en el Informe Mundial sobre el Alzheimer del año 2009.

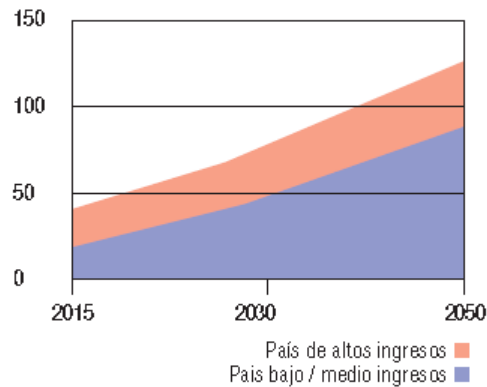


Figura 3. Número de personas con demencia en el mundo (en millones) con alto, medio y bajo ingreso en el año 2015 y la perspectiva de casos a futuro. Modificado de World Alzheimer Report, (2015).

Las estimaciones de prevalencia de demencia en personas de 60 años y mayores, van del 4.6% en Europa Central al 8.7% en África del Norte y el Medio Oriente; por ello, la estimación para cualquier otra región cae entre el 5.6% y el 7.6%. Cuando comparamos las estimaciones realizadas en el 2009, la prevalencia actual es mayor en el Este de Asia y África, por lo que conforme pasan los años, los cálculos quedan subestimados con respecto a la realidad y que por ello es importante crear medidas para evitar el avance de la enfermedad.

El 58% de las personas con demencia vive en países clasificados por el Banco Mundial como de bajos y medianos ingresos. Se estima que en estos países la proporción aumentará al 63% en el 2030 y al 68% para el 2050.

La EA es considerada como el tipo más común de demencia, ya que corresponde a aproximadamente 50-60% de todos los casos. Sin embargo, debido a las superposiciones en la sintomatología, fisiopatología y factores de riesgo, la EA y la demencia vascular no son fácilmente distinguibles (Rizzi *et al.*, 2014).

En estudios previos se han identificado los factores de riesgo para la demencia que son potencialmente modificables y se ha observado que están relacionados con lo siguiente:

- La reserva cognitiva (educación y el logro ocupacional).
- Factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, la hipertensión, la diabetes y la obesidad).
- Estilo de vida y factores psicosociales (depresión, actividad física y consumo de alcohol) (Sosa-Ortiz *et al.*, 2012).

En 2015, se estimó que alrededor de 44 millones de personas en el mundo tienen EA o alguna demencia. Cada año, aparecen 4.6 millones de nuevos casos demencia. Menos del 2% de todos los casos de demencia tipo Alzheimer son pacientes con EA de tipo familiar (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015).

En México, la Secretaría de Salud a través del Instituto Nacional de Geriátrica, reportó que hacia finales del año 2015 había alrededor de 850 mil casos con EA, y la incidencia de la enfermedad es de 25 por cada mil personas mayores de 60 años por año. Esto se debe a las condiciones de vida de la población en general, tales como la dieta, la actividad física y el estrés, que conducen a procesos patológicos como la obesidad, la diabetes, la hipertensión; los cuales generan o aceleran la progresión del deterioro cognitivo (SSA, 2015).

2.1.3. Diagnóstico de la EA

Existe un gran interés en la identificación de pacientes en estadios tempranos de la enfermedad, antes de la manifestación clínica de demencia, a fin de proporcionar una intervención temprana eficaz que tiene como objetivo retrasar el deterioro cognitivo. El diagnóstico definitivo de la EA requiere un examen microscópico detallado de la autopsia del cerebro. Hoy en día, la EA puede ser diagnosticada con más de 95% de precisión en pacientes vivos, mediante el uso de una combinación de herramientas. Estas incluyen tomar una historia clínica cuidadosa de los pacientes y sus familias, y la evaluación de la función cognitiva mediante pruebas neuropsicológicas (Isik, 2010).

En el presente, la única forma definitiva de diagnóstico es determinar si hay placas A β y MNF en el tejido cerebral; sin embargo, para observar el tejido cerebral es necesario realizar biopsia o autopsia, por lo cual los médicos sólo pueden hacer un diagnóstico posible o probable de la enfermedad mientras la persona está viva. En centros especializados puede diagnosticarse acertadamente la enfermedad hasta en 90% de los casos. Para ello, se utilizan varios instrumentos, entre los cuales se encuentran:

- Historial clínico adecuado.
- Valoración de la capacidad para llevar a cabo las actividades diarias.
- Pruebas neuropsicológicas de memoria, resolución de problemas, atención, cálculo y lenguaje.
- Estudios clínicos (pruebas de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo).
- Estudios de imagen (tomografía, resonancia magnética o gammagrafía) (Xu *et al.*, 2016).

Dado que el diagnóstico de EA en vida es eminentemente clínico, se han determinado criterios que deben cumplirse para definirlo; los más conocidos y utilizados son los del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) (Cuadro 3) y del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Trastornos Relacionados con la Enfermedad de Alzheimer y Enfermedad Vascular (NINCDS-ADRDA) (Ramírez-Díaz y col., 2011).

2.1.4. Clasificación de la EA

La EA ha sido clasificada en dos tipos de acuerdo a sus características patológicas y edad de aparición (Shea *et al.*, 2015). La EA puede ser de tipo familiar (inicio temprano) o esporádico (inicio tardío) (Mena-López y col., 2005). El riesgo genético en la EA familiar de inicio temprano difiere del de la forma de inicio tardío o esporádico de la enfermedad (Chu, 2012).

Cuadro 3. Criterios para el diagnóstico de EA de acuerdo al DSM-IV

A. Desarrollo de déficit cognitivos múltiples manifestado por:

- 1. Trastorno de memoria (pérdida de la habilidad para aprender nueva información o recordar la información aprendida)**
- 2. Al menos uno o dos de los siguientes trastornos:**
 - **Afasia (alteración de lenguaje).**
 - **Apraxia (alteración en la habilidad para desarrollar actividades motoras a pesar de una función motora intacta).**
 - **Agnosia (alteración en la capacidad para reconocer objetos a pesar de una función sensorial intacta).**
 - **Trastorno de funciones ejecutivas (planificación, organización, abstracción, juicio, funciones visuoespaciales).**

B. El déficit cognitivo en los criterios A1 y A2 representa una disminución del funcionamiento previo y causa una alteración significativa en las actividades social y ocupacional.

C. El curso es caracterizado por un comienzo gradual y deterioro cognitivo continuo.

D. El déficit cognitivo en los criterios A1 y A2 no debe ser ocasionado por alguno de los siguientes:

- **Otras causas que ocasionen déficit progresivo en la memoria y cognición (enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia normotensa, tumor cerebral).**
- **Enfermedades sistémicas que causen demencia (hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico, deficiencia de niacina, hipercalcemia, neurosífilis, infección por VIH).**

E. No se manifiesta exclusivamente en el curso de un delirio (pero demencia y delirio pueden coexistir).

F. El trastorno debe tener cierta gravedad para repercutir en la vida diaria del paciente.

G. El trastorno debe ser adquirido.

H. La alteración es explicada por otra enfermedad psiquiátrica.

Fuente: Ramírez-Díaz *et al.*, (2011).

2.1.4.1. Enfermedad de Alzheimer familiar (EAf)

La EA de aparición temprana (<60 años de edad) o familiar autosómica dominante (EAf) se presenta en el 0.5 % de todos los casos de EA en individuos con historial familiar de al menos tres generaciones. Aproximadamente, el 50 % de los casos de EAf acarrean mutaciones en cualquiera de los genes llamados presenilina-1 (PSEN-1), presenilina-2 (PSEN-2) y la proteína precursora amiloide (APP), por sus siglas en inglés Amyloid Precursor Protein. Juntas, explican el 5-10% de la ocurrencia en la EAf. La identificación de mutaciones en estos genes no sólo ha proporcionado conocimientos importantes en los mecanismos moleculares y rutas implicadas en la patogénesis de la EA sino que también condujo a los objetivos valiosos que actualmente se utilizan en el diagnóstico y el desarrollo de fármacos (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015). En estos pacientes han sido identificadas más de 230 mutaciones en cualquiera de los tres genes involucrados en la EAf. Estas mutaciones incrementan la producción de fragmentos A β de 42 aminoácidos (A β 42), el fragmento neurotóxico más común en pacientes con EA, lo cual resulta en una aparición joven de la EAf (Shea *et al.*, 2015).

2.1.4.1.1. Proteína Precursora Amiloide (APP)

Los genes que codifican para la proteína precursora amiloide se encuentran en el cromosoma 21 (21q21.2-21q21.3) y fueron unos de los primeros genes causales identificados para la EA. Hay al menos 10 isoformas de APP diferentes. La función exacta de la APP no está definida, pero varias funciones posibles se han sugerido como el desarrollo sináptico, la migración neuronal, o como un receptor. Como se muestra en la Figura 4, la APP se escinde en moléculas A β , incluyendo A β 42, que se secretan y después se puede acumular en el cerebro formando placas neuríticas (Ridge *et al.*, 2013). La APP es procesada proteolíticamente por la α -, β -, y γ -secretasas (Cuadro 4) siguiendo dos rutas: la constitutiva (no amiloidogénica) o la amiloidogénica, generando la producción de diferentes péptidos. En la ruta

constitutiva, la proteólisis de la proteína APP por las α - y γ -secretasas resulta en fragmentos no patógenos (sAPP α y el fragmento C-terminal α); sin embargo, en la vía amiloidogénica, enriquecida en las neuronas, la consecuente proteólisis de la APP por la β -secretasa y la γ -secretasa da lugar a una mezcla de péptidos A β con diferentes longitudes (Van Cawenberghe *et al.*, 2015).

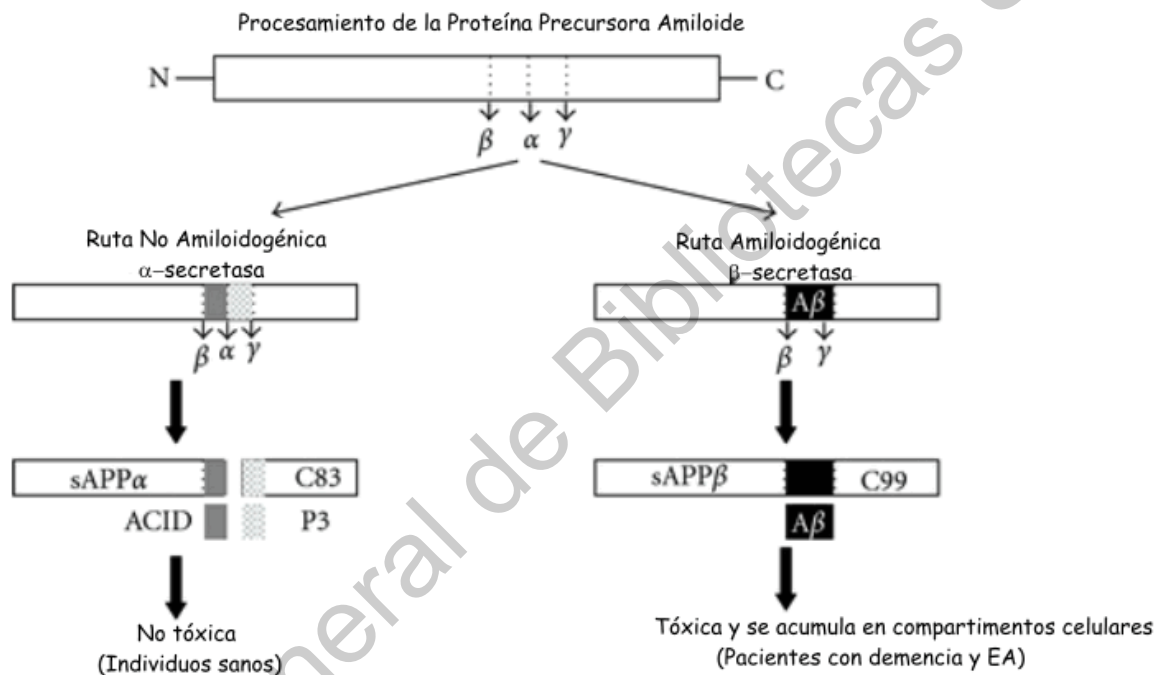


Figura 4. Vías amiloidogénica y no amiloidogénica para la generación de péptidos A β en neuronas. Modificado de Spuch *et al.*, (2012).

Cuadro 4. Grupo de proteínas pertenecientes a las tres secretasas

Secretasa	Miembro en mamíferos
α -secretasa	ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM17, ADAM19 y MDC9
β -secretasa	BACE1 y BACE2
γ -secretasa	PSEN1, PSEN2, nicastrina, APH-1, y PEN-2

Fuente: Modificado de Sun *et al.*, (2015).

2.1.4.1.2. α -secretasa

Secretasa es un término genérico acuñado hace más de 20 años para referirse a un grupo de proteasas responsables de la escisión de un gran número de proteínas de membrana. Estos eventos endoproteolíticos resultan en la liberación extracelular o intracelular de metabolitos solubles asociados con una amplia gama de funciones fisiológicas intrínsecas. La α -secretasa se refiere a la actividad sobre su proteína blanco, la APP, y la generación de sAPP α , un fragmento extracelular soluble potencialmente asociado con funciones neurotróficas y neuroprotectoras. La escisión de la APP por la α -secretasa (Figura 4) se produce en el centro de la secuencia del péptido A β entre Lys-16 y Leu-17. El sitio preciso en el que tiene lugar la escisión se cree que está determinado principalmente por una conformación α -helicoidal y una distancia de 12-13 residuos de la unión hidrolizada de la membrana. La actividad α -secretasa sobre la APP conduce a la producción de un fragmento carboxiterminal anclado a la membrana llamado C83 y para la liberación extracelular del fragmento soluble sAPP α . Varias proteasas de la familia de las desintegrinas y metaloproteinasas (ADAM), incluyendo ADAM10 y ADAM17, han sido directa o indirectamente asociadas con actividades α -secretasa constitutiva y reguladora. Las ADAMs son caracterizadas por la presencia de dominios de aminoácidos conservados requeridos para dirigir proteínas a rutas secretoras; le sigue un prodominio, responsable del plegamiento correcto de las proteínas; un dominio de metaloproteína, un dominio desintegrina, una región rica en cisteína, un dominio parecido al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (excepto para ADAM10 y ADAM17), un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático (Vingtdeux y Marambaud, 2012).

2.1.4.1.3. β -secretasa

Poco después de la caracterización de la APP, su procesamiento y la producción de A β , a principios de 1990, los intensos esfuerzos en el mundo académico y la industria farmacéutica estaban en marcha para identificar a la β - y γ -secretasas, ya

que estaba claro que estas enzimas eran dianas terapéuticas principales para la EA. Ensayos genéticos, bioquímicos y celulares fueron desarrollados específicamente para la identificación de dichas secretasas. En 1999, cinco grupos independientemente descubrieron la identidad molecular de la enzima β -secretasa y la llamaron BACE, Asp2, o memapsina 2. Los grupos utilizaron metodologías experimentales diferentes, incluyendo la clonación de expresión, estrategias genómicas, y purificación bioquímica, para descubrir la β -secretasa (en adelante, BACE1). Todos llegaron a la misma secuencia de polipéptido a partir de estos diferentes enfoques, aumentando así la confianza de que la auténtica enzima β -secretasa había sido identificado (Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 1999).

La caracterización inicial de BACE1 demostró que la enzima exhibía todas las propiedades moleculares y celulares esperadas para la β -secretasa (Vassar *et al.*, 2010). BACE1 es una proteasa aspártica transmembranal compuesta por 501 aminoácidos de tipo I que está relacionada con la familia de la pepsina y las proteasas aspárticas retrovirales. El dominio catalítico BACE1 contiene dos motivos importantes con sitio activo de ácido aspártico (DT / SGS / T) que están separados por aproximadamente 200 residuos, similar a las pepsinas (Figura 5). El sitio activo de la enzima se orienta topológicamente en el mismo lado de la membrana como el sitio de escisión β -secretasa de APP (BACE), como se requiere para la β -secretasa.

Por otra parte, BACE1 está localizada dentro de los compartimentos intracelulares ácidos, incluyendo endosomas y la red trans-Golgi, y tiene actividad enzimática óptima a pH ácido, como se había predicho para la β -secretasa. BACE1 se expresa en niveles bajos en la mayoría de los tipos de células del cuerpo, aunque es más altamente expresado en las neuronas. Por último, BACE1 tiene la especificidad de escisión correcta prevista para la β -secretasa: BACE1 escinde en Asp+1 y Glu+11 de la secuencia A β ; la sobreexpresión y la expresión disminuida de BACE1 aumenta y disminuye la producción de sAPP β , C99, y de A β , respectivamente; le expresión

disminuida de BACE1 aumenta la producción de sAPP y de p3; secuencia de especificidad de BACE1 en P1 es Leu >> Met> Val. En conjunto, estas características de BACE1 hicieron un muy fuerte candidato β -secretasa (Vassar *et al.*, 2014).

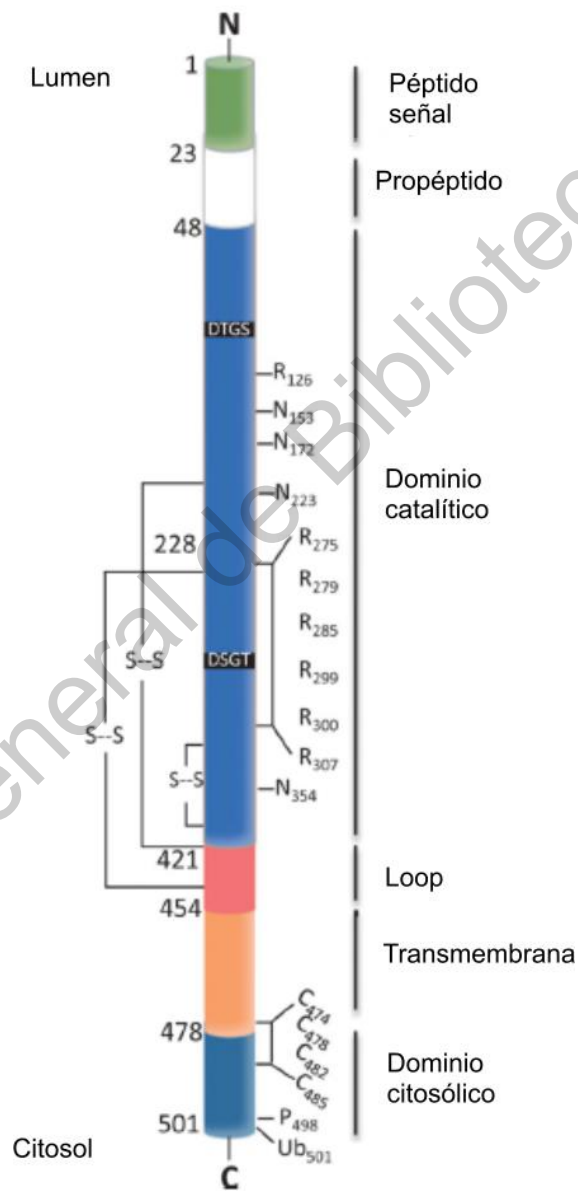


Figura 5. Estructura de BACE1. Los motivos importantes con sitio activo de ácido aspártico con posiciones en los aminoácidos 93 y 289 están marcados en negro. Modificado de Vassar *et al.*, (2014).

Poco después de que fue BACE1 fue identificado, otra aspartil proteasa que escinde de APP dentro de la secuencia de β -amiloide fue secuenciada. Esta proteína se llamó BACE2 (memapsina 1, Asp1). Tanto BACE1 (localizado en el cromosoma 11q 23.2) como BACE2 (localizado en el cromosoma 21q22.3) presentan 64% de similitud de aminoácidos (Sathya *et al.*, 2012). Una de las diferencias de BACE2 con BACE1 es que ésta se encuentra expresada en astrocitos, mientras que BACE1 en neuronas; además, se ha observado que BACE2 tiene efectos neuroprotectores, ya que fue reportado que la sobreexpresión de BACE2 en cultivos primarios de neuronas derivados de ratones transgénicos APP redujo la producción de péptidos $A\beta$ (Sun *et al.*, 2005).

2.1.4.1.4. Presenilinas

Las presenilinas pertenecen a la familia de las proteasas de aspartato y que están involucradas en la proteólisis intramembranal regulada, un mecanismo que se utiliza para escindir enlaces peptídicos dentro de la bicapa lipídica. Las presenilinas son holoproteínas de 50 kDa que contienen 9 dominios transmembranales y residen principalmente en la membrana del retículo endoplásmico (RE), el grupo amino-terminal se encuentra orientado hacia el citosol y el carboxi-terminal hacia el lumen del RE. Las presenilinas se encuentran acopladas con subunidades proteicas como la nicastrina, la faringe anterior defectuosa-1 (APH-1) y el potenciador de presenilinas 2 (Pen-2) que producen el complejo multimérico γ -secretasa (Figura 6), el cual es transportado a las estructuras de la superficie celular y endosomal para escindir proteínas transmembranales de tipo I como Notch y la proteína precursora de amiloide (APP) (Supnet y Bezprozvanny, 2011). Además de producir el fragmento $A\beta$, el complejo γ -secretasa genera un fragmento derivado del dominio intracelular de la APP (AICD), el cual posee actividad transcripcional y puede regular la transcripción de múltiples genes incluyendo APP, la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK- 3β), el gen de la secuencia 1 del síndrome de Kallman (KAI1), la neprilisina, BACE1, el gen supresor de tumores p53, el receptor del factor de crecimiento

epidérmico (EGFR), y la proteína relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad (LRP1) (Zhang *et al.*, 2014).

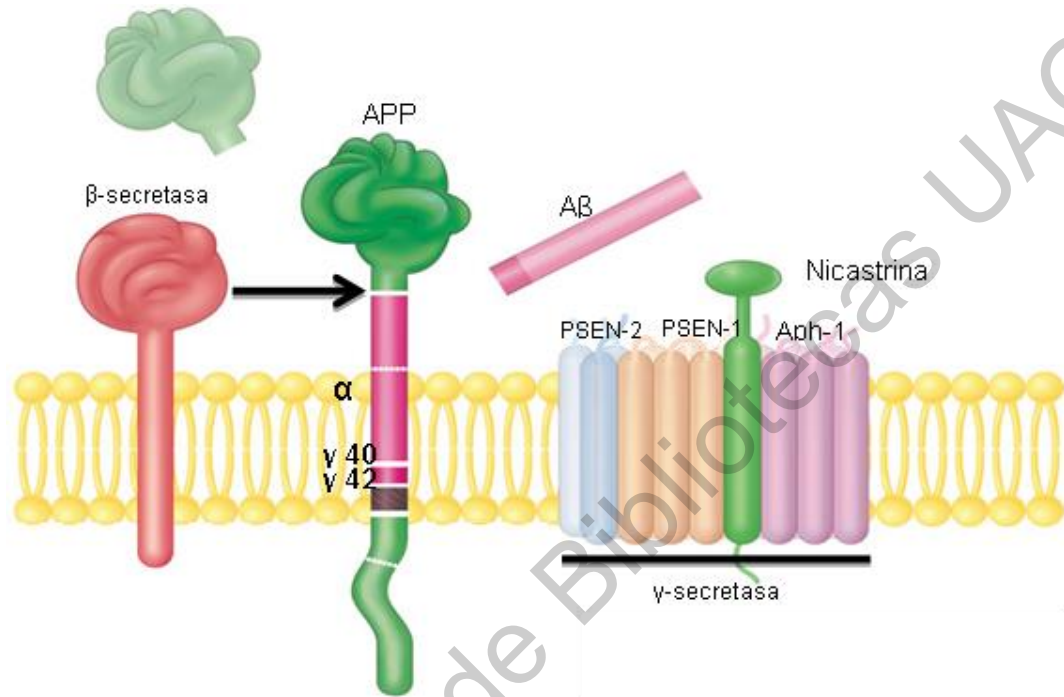


Figura 6. Diagrama de APP y la producción de Aβ. Modificado de Nestler *et al.*, (2009).

2.1.4.2. Enfermedad de Alzheimer esporádica (EAs)

El otro tipo de EA es la EA de aparición tardía (>65 años de edad) o esporádica (EAs), que usualmente tiene una aparición esporádica y es multifactorial, de ahí su nombre. Los factores de riesgo que se presentan con mayor incidencia en los pacientes con EAs son la diabetes, la hipertensión, la hipercolesterolemia, obesidad y síndrome metabólico, los cuales están relacionados al metabolismo de lípidos. La EA ha sido asociada a fenómenos de estrés oxidativo, daño mitocondrial, polimorfismos en ApoE y daño del endotelio vascular (Luque-Contreras *et al.*, 2014) que conllevan al incremento de fragmentos Aβ₄₂ conduciendo a una elevación en la formación de placas amiloides y de procesos excitotóxicos.

2.1.4.2.1. Factores de riesgo de la EA esporádica

Los factores de riesgo de la EAs son clasificados como genes de susceptibilidad y los no genéticos. La EAs también tiene como un fuerte componente genético a la Apolipoproteína E (ApoE) (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011). La identificación de nuevos *loci* que incrementan el riesgo de EAs es fundamental para la comprensión de la etiología subyacente de la EA. Estudios de asociación del genoma completo han identificado polimorfismos en o cerca de varios genes que están asociados con el riesgo de la EA, incluyendo ABCA7, CLU, CR1, CD33, CD2AP, EphA1, BIN1, PICALM y MS4A (Figura 7) (Karch y Goate, 2015).

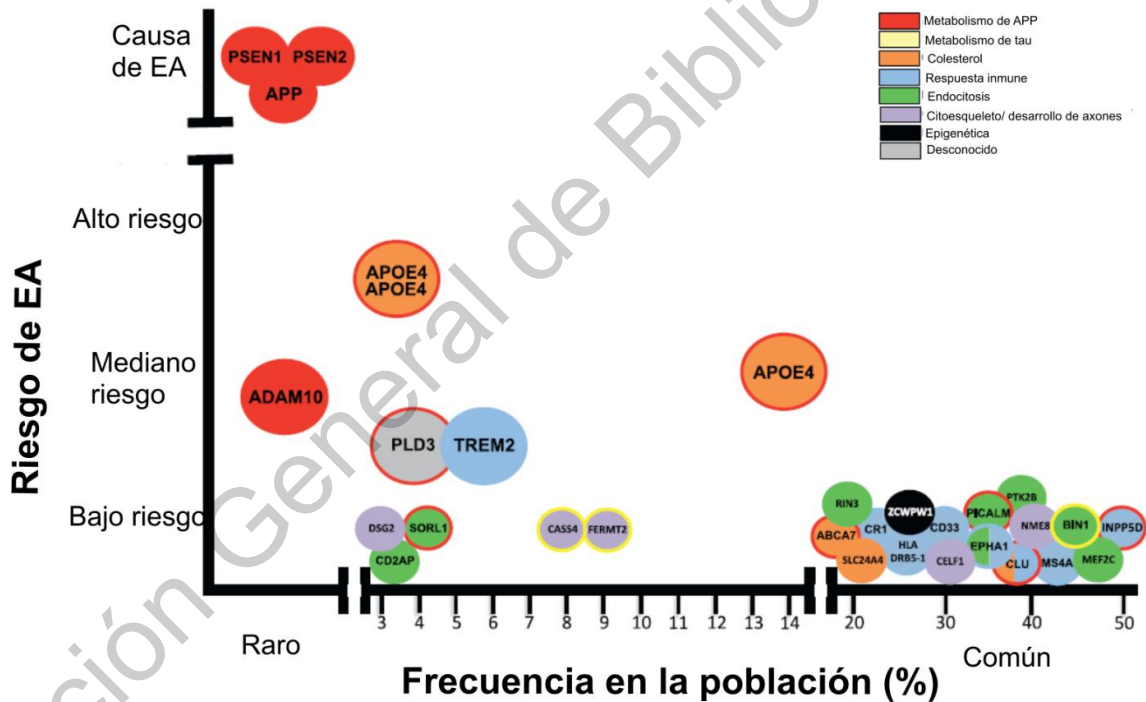


Figura 7. Variantes raras y comunes que contribuyen al riesgo de la EAs obtenidos mediante estudios de asociación del genoma completo. Modificado de Karch y Goate, (2015).

Entre los factores de riesgo no genéticos para la EAs se encuentran la edad, el sexo, la actividad física, la obesidad, la hipertensión a mediana edad, y diabetes mellitus.

Estudios de meta-análisis han demostrado que la razón de posibilidades de que las mujeres desarrollen la EA en relación con los hombres es de 1.56. Asimismo, estudios epidemiológicos recientes han demostrado que procesos patológicos como la obesidad, la hipertensión y la diabetes mellitus incrementan el riesgo de padecer la EAs con cocientes de riesgo de 1.80 y 1.39 para obesidad y diabetes, respectivamente (Shinohara *et al.*, 2014).

2.1.4.2.1.1. Apolipoproteína E (ApoE)

Las apolipoproteínas son una familia de proteínas implicadas en la homeostasis de los lípidos. Estas proteínas se unen y transportan los lípidos a través de los sistemas linfático y circulatorio. Dos apolipoproteínas diferentes y un transportador ABC han demostrado estar asociados con EA. El primero es la apolipoproteína E (ApoE), que se encuentra en el cromosoma 19 (19q13.2) y consta de cuatro exones totales (tres codificantes). Sólo hay una isoforma principal, que codifica la proteína de 299 aminoácidos de longitud y una masa molecular de ~46kDa. ApoE es un componente de los quilomicrones y desempeña un papel fundamental en el aclaramiento de lipoproteínas de muy baja densidad de la circulación.

La alteración en la función de ApoE resulta en un aumento de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos. Hay tres alelos primarios ApoE ϵ 2: (rs429358), ϵ 3 (tipo salvaje), y ϵ 4 (rs7412). Estos alelos difieren por sustituciones en las posiciones 112 y 158 (posiciones de proteínas que corresponden a la proteína procesada) donde el alelo de tipo salvaje ϵ 3 es Cis112 y Arg158, ϵ 2 es Cys112 y Cis158 y ϵ 4 es Arg112 y Arg158. ϵ 3 tiene estimada una frecuencia de la población de 78,3 %, mientras que ϵ 2 tiene una frecuencia de la población de 6,4 % y ϵ 4 14,5 %. El alelo ϵ 4 es el factor de riesgo genético conocido más importante para la EA de aparición tardía (Ridge y col., 2013; Holtzman y col., 2012).

El factor de riesgo más ampliamente estudiado para la Enfermedad de Alzheimer es la Apolipoproteína E (ApoE). Las personas que llevan una o dos copias del alelo

$\epsilon 4$ de la ApoE tienen un riesgo incrementado de desarrollar la Enfermedad de Alzheimer, sin embargo el alelo $\epsilon 4$ no es necesario o suficiente para causar la EA (Prasanthi y col., 2010).

La ApoE es producida principalmente por el hígado, los macrófagos y el SNC. En el SNC ésta es producida mayoritariamente por los astrocitos y la microglía; sin embargo, la expresión neuronal de la ApoE puede ser inducida en respuesta a estrés o daño, probablemente para el propósito de reparación y remodelamiento neuronal.

La ApoE está estrechamente ligada al transporte del colesterol desde la sangre hacia el cerebro y vehículo de colesterol desde los astrocitos hacia las neuronas vía receptores ApoE, los cuales son miembros de la familia de receptores a lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Liu *et al.*, 2013; Holtzman *et al.*, 2012); esto ha sido propuesto debido a que la ApoE en los quilomicrones es el mayor transportador de colesterol en el cerebro y por lo tanto es esencial para la sinaptogénesis en las neuronas, entonces las diferencias dependientes de isoforma de la ApoE en estos procesos pueden impactar negativamente en la plasticidad sináptica o en la recuperación neuronal de la neurodegeneración, como puede ocurrir en la EA; en respuesta a daño excitotóxico, las neuronas responden con un incremento significativo de la expresión de ApoE (Rohn, 2013); la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE está asociado con un incremento en los niveles de colesterol en plasma. Por la conexión ApoE-colesterol, la homeostasis del colesterol ha sido considerada desde la década pasada como un potencial factor de riesgo para la EA (Prasanthi *et al.*, 2010).

En la EA esporádica o de aparición tardía, el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína-E aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad como un gen de susceptibilidad, los genotipos ApoE $\epsilon 2/\epsilon 4$ o $\epsilon 3/\epsilon 4$ aumentan el riesgo aproximadamente tres veces, y el genotipo ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$ aumenta el riesgo aproximadamente 15 veces. El riesgo atribuible a la población (es decir, la proporción con EA de inicio tardío asociado con

ApoE) se estima en 20%, por lo que es el factor de riesgo más importante. Las variantes alélicas ApoE pueden estar implicadas en la degradación o eliminación de A β desde el cerebro (Chu, 2012).

La manera en que la ApoE-4 interviene en la etiopatogenia de la EA no se conoce con certeza, sin embargo existen algunas teorías, quizá la más consensuada apunta a que esta lipoproteína coadyuva en la fijación del A β intraneuronal; las siguientes evidencias en parte apoyan la hipótesis anterior: a) las personas con enfermedad de Alzheimer poseen mayor carga para ApoE-4; b) este grupo tiene mayor cantidad de depósitos de amiloide y de placas neuríticas que personas sanas c) compromete los caminos metabólicos del A β , y d) predispone a las lesiones neurofibrilares actuando directamente en los microtúbulos neuronales (García *et al.*, 2009).

La acumulación de A β y tau hiperfosforilado en el cerebro juegan un papel muy importante en los procesos neurodegenerativos que ocurren en la EA por potenciación del daño neuronal. En adición a A β y tau fosforilada, el estrés oxidativo es un importante marcador de EA; además, el estrés oxidativo puede ser el cambio más temprano que ocurre en la patogenia de la EA. La hipercolesterolemia es un factor que causa estrés oxidativo por incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Subsecuente al estrés oxidativo, los niveles de isoprostanos F2 incrementan y los niveles de glutatión (GSH). El estrés oxidativo puede también activar el retículo endoplásmico (RE) en respuesta al estrés, y el constante estrés del RE puede conducir a mayor daño oxidativo y muerte celular (Prasanthi y col., 2010).

2.1.4.2.1.2. Hipercolesterolemia

Altos niveles de colesterol en suero y plasma han sido sugeridos como un factor de riesgo para la EA. En el cerebro adulto, la síntesis de colesterol primaria se produce en los astrocitos y, en menor medida, en las neuronas; se transporta dentro del

cerebro por lipoproteínas de alta densidad locales (HDL). Los niveles de LDL (lipoproteína de baja densidad) se encuentran elevados constantemente en enfermedades cardiovasculares, además de que se observa un aumento de la modificación oxidativa sistémica (oxLDL) y la nitración durante la hipercolesterolemia.

El colesterol que es sintetizado *de novo* y absorbido de la dieta puede ser oxidado a través de mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. La oxidación del colesterol juega un papel importante para la producción de moléculas intermediarias activas que están implicadas en rutas sintéticas para los ácidos biliares, hormonas y la vitamina D. La oxidación no enzimática de colesterol requiere metales de transición o especies reactivas de oxígeno que se encuentran inevitablemente en los sistemas biológicos. Se han reportado algunos colesteroles oxidados (Oxisteroles) entre los cuales se incluyen el 6-colesten-5 α -hidroperóxido, 7-oxocolesterol (7-cetocolesterol), 7 β -OHC (7 β -hidroxicolesterol), 7- dehidrocolesterol y 25-OHC (25-hidroxicolesterol), como se muestra en la Figura 8 (Dias *et al.*, 2014).

Oxisteroles como 24-OHC y 27-OHC han sido implicados en la patogénesis de la EA. El 24-OHC es producido exclusivamente por la 24S-hidroxilasa específica de cerebro (CYP46A1) y representa un mecanismo homeostático para remover el exceso de colesterol a través de un gradiente de concentración vía barrera hematoencefálica (BHE). Por otro lado, el 27-OHC es producido mayoritariamente fuera del cerebro, y es formado por la enzima 27-hidroxilasa (27-OHC), que está presente en muchos órganos y tejidos (Lim *et al.*, 2014).

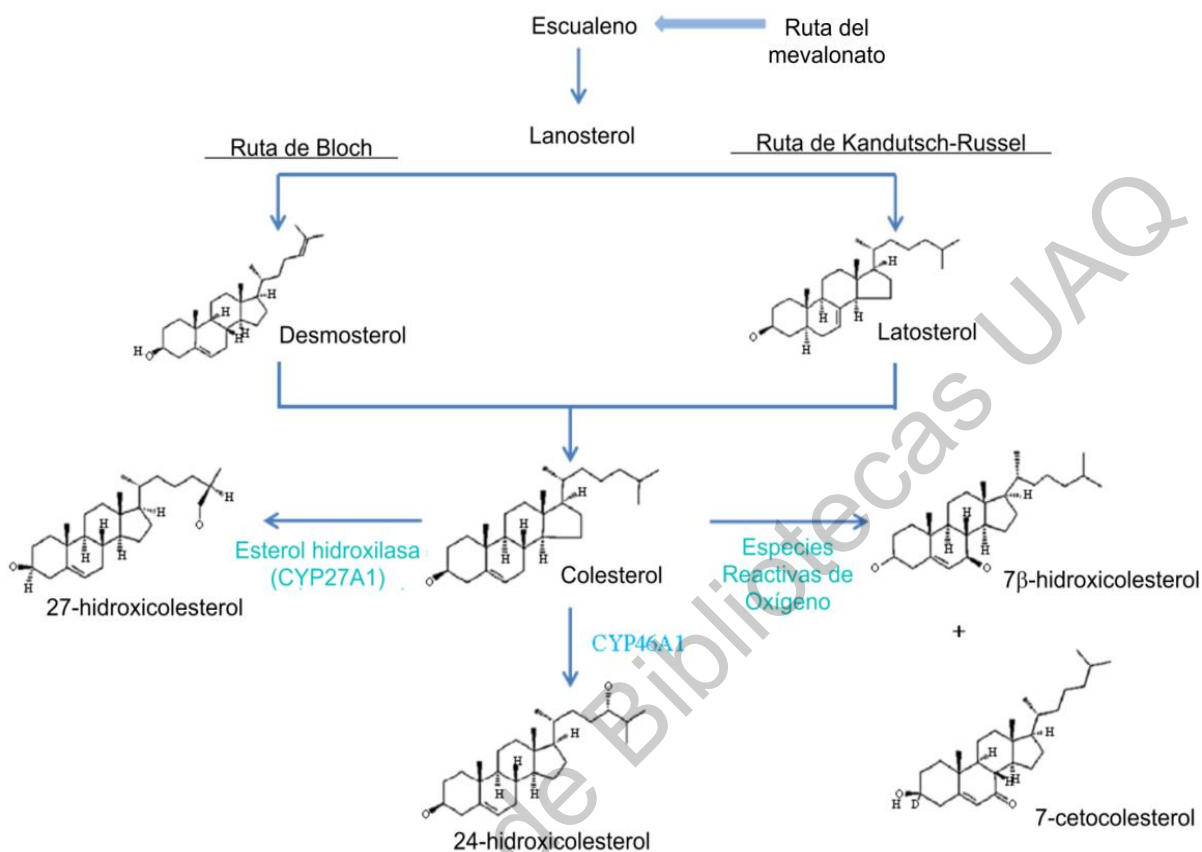


Figura 8. Vías de síntesis de colesterol. Modificado de Lim *et al.*, (2014).

2.1.4.2.1.3. Hipertensión

Varios estudios han relacionado la hipertensión con la atrofia cerebral, lesiones de sustancia blanca, y la generación de MNF, por lo tanto, una asociación entre la hipertensión y la EA es concebible. Sin embargo, esta asociación es compleja y difiere con la edad. Varios estudios muestran que la hipertensión a mediana edad se encuentra relacionada con un mayor riesgo de EA, mientras que otros estudios no encontraron una asociación entre la hipertensión en la edad avanzada y la demencia (de Bruijn e Ikram, 2014).

2.1.4.2.1.4. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) representa otra enfermedad prevalente asociada con obesidad y a menudo con el envejecimiento y es considerada como un factor de riesgo para la EA. La T2DM es caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre que resulta en una producción de glucosa hepática incrementada, el deterioro de la producción de insulina por las células β -pancreáticas y la resistencia a la insulina (Butterfield *et al.*, 2014). Los pacientes con T2DM presentan mayores riesgos de complicaciones cerebrales, incluyendo accidentes cerebrovasculares, deterioro cognitivo y demencias. Estos riesgos también se agregan a un conjunto de complicaciones sistémicas, tales como retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica, acompañando anomalías en la microcirculación y lesiones macrovasculares en diversas arterias sistémicas (Peila *et al.*, 2002).

Los mecanismos patogénicos a través de los cuales la T2DM provoca deterioro cognitivo no están claramente establecidos. Los escenarios propuestos entre la diabetes y la demencia son numerosos: lesiones vasculares, inflamación, estrés oxidativo, elevación de los productos finales de la glucólisis, resistencia a la insulina y anormal señalización de sus receptores, degradación de la insulina y su relación con los depósitos de proteína A β (Miyakawa, 2010; Kapogiannis y Mattson, 2011). Dos de las hipótesis acerca de la patogenia que origina la neuropatía diabética están basadas en cambios microangiopáticos y en las anomalías metabólicas relacionadas con la insulina y la glucosa. También ha surgido una tercera hipótesis multifactorial que involucra al estrés oxidativo (Domínguez *et al.*, 2014).

Numerosas investigaciones sustentan la hipótesis que la EA responde a una patogenia basada en alteraciones de la energía neuronal, originada por insuficiencias en la función de la glucosa. Las anomalías metabólicas están relacionadas con el factor insulínico de crecimiento cerebral, que regula la producción de energía y la resistencia a la insulina (Domínguez *et al.*, 2014).

Asimismo, la resistencia a la insulina fue revelada en pacientes con EA al ser comparados con controles no dementes: en pacientes con EA se hallan mayores valores de hiperglucemia y mayor número de ovillos neurofibrilares. La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia generan engrosamiento de las paredes de las arterias y variaciones asociadas a modificaciones en la permeabilidad vascular que conllevan a la isquemia tisular (Kubota *et al.*, 2003).

La diabetes resulta en una señalización de insulina disfuncional que lleva a la disminución de la actividad de la vía de mTOR (Figura 9) la cual termina en una falla de la autofagia para la acumulación de A β , inhibe la re-entrada de neuronas post-mitóticas en el ciclo celular, estimula vías de crecimiento anormal, genera la pérdida del control traduccional y el daño a la neurogénesis (Sandhir y Gupta, 2015). La quinasa S6 (S6K) es activada por mTOR para fosforilar y degradar al sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) que en última instancia conduce a la desensibilización de la insulina. La señalización mTOR tiene interacción con proteínas A β y tau que son dos marcadores de la EA en sus formas agregadas, además, se informó en 2012 que el péptido A β es un activador de la vía PI3K / Akt y que enciende la cascada de mTOR (Oddo, 2014).

En trabajos previos se encontró la orquesta molecular río abajo de los receptores a insulina y se especuló que la activación de estos lleva a activar la cascada PI3K/PKB, en donde GSK3 β , que es una proteína muy importante de esta vía, participa en la depresión y la potenciación a largo plazo (LTP/LTD), que es un único mecanismo de formación de la memoria y la plasticidad sináptica. Aparte de la insulina, PI3K puede ser activado por múltiples ligandos del factor de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y el factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) (Sandhir y Gupta, 2015).

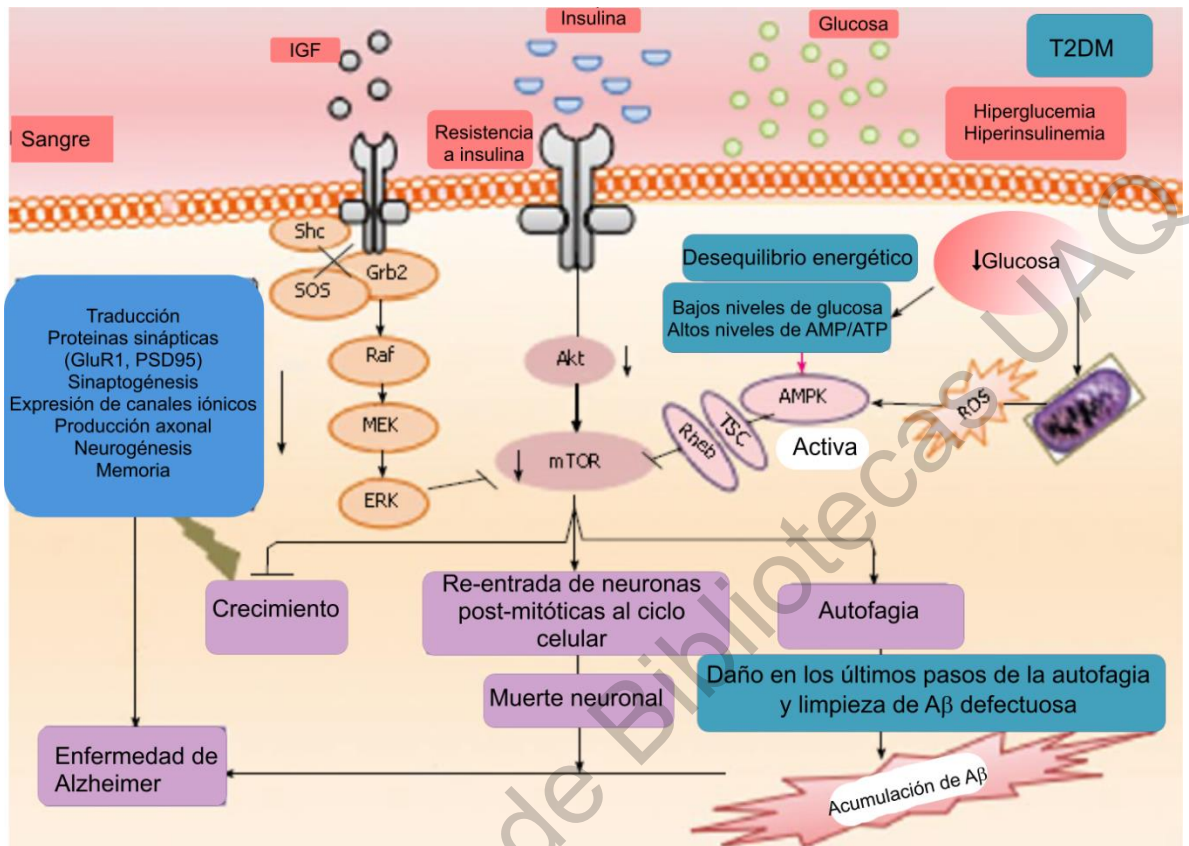


Figura 9. Esquema de la intersección de la vía de rapamicina entre la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) y la Enfermedad de Alzheimer (EA). Modificado de Sandhir y Gupta, (2015).

Un mecanismo común entre la diabetes y la EA es la inflamación, para lo cual se ha reportado en estudios previos en pacientes con EA una elevación de los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , etc; sin embargo, en pacientes con diabetes, la elevación de TNF- α desencadena la activación de diversas quinasas de estrés que fosforilan a IRS-1 (en residuos de serina inhibitorios) e interrumpe la señalización de insulina (Figura 10), mientras que el bloqueo de TNF- α rescató sus efectos en un modelo de ratón obeso. JNK y la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena son las principales quinasas de estrés que son importantes reguladores comunes entre la inflamación y el metabolismo. Dado que la señalización de la insulina contribuye al funcionamiento normal de las

neuronas, cualquier alteración mediada por inflamación en estos, resulta en una función neuronal defectuosa (Sandhir y Gupta, 2015).

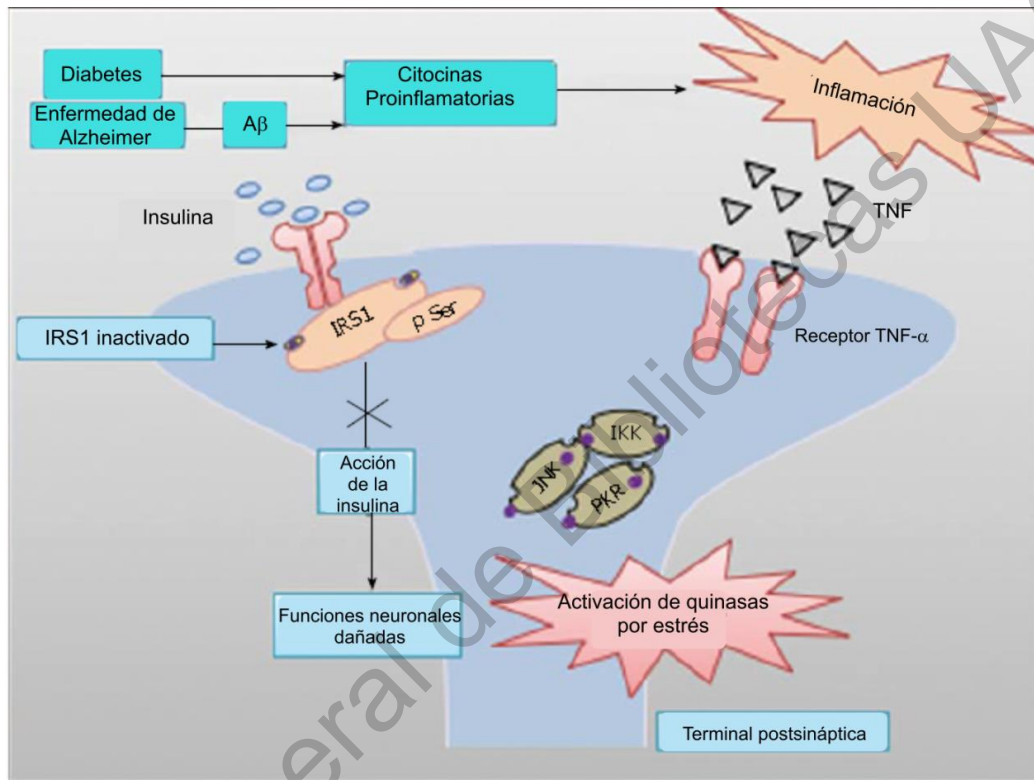


Figura 10. Representación de la vía común entre la disfunción de la señal de insulina en la EA y diabetes mellitus de la cascada inflamatoria. Modificado de Sandhir y Gupta, (2015).

2.1.4.2.2. Efectos de los factores de riesgo de la EAs en la neurodegeneración

2.1.4.2.2.1. Estrés oxidativo

Se ha informado ampliamente que los radicales libres son patológicamente importantes en las enfermedades neurodegenerativas, y que el tejido cerebral está expuesto al daño oxidativo durante el desarrollo de la EA, ya desde su inicio

temprano (Gamba *et al.*, 2015). El estrés oxidativo puede ser definido como un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o su eliminación (Luque-Contreras *et al.*, 2014).

Las neuronas contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que pueden interactuar con las ROS (Cheng y Zhong, 2014). A bajas concentraciones, las ROS participan en la regulación del funcionamiento de la célula mediante la activación de cascadas de señalización intracelular, mientras que a concentraciones más altas ROS puede causar estrés oxidativo, una condición en la que la producción de ROS supera las defensas antioxidantes, resultando en daños en lípidos, proteínas y ADN (Valko *et al.*, 2007), generando biomarcadores tanto en pacientes con EA como en modelos animales de la EA; entre estos marcadores sanguíneos están los carbonilos proteicos, 3-nitrotirosina, 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), 8-hidroxiguanosina (8-OHG), malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-nonal (4-HNE) e isoprostanos-F2 (F2-IsoPs) (Chen y Zhong, 2014).

El estrés oxidativo es una característica de envejecimiento y de las enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo la EA. Debido a su alta tasa de consumo de oxígeno, la presencia de metales redox-activos y de limitadas defensas enzimáticas antioxidantes, el cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo (Aliev *et al.*, 2011), además, el aumento de los niveles de peroxidación de lípidos y la oxidación de ácidos nucleicos son un hallazgo consistente en el cerebro de pacientes con EA (Smith *et al.*, 2000).

El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo por numerosas razones, pero principalmente porque utiliza alrededor del 25% del oxígeno respirado, con el consiguiente aumento de los radicales libres; también contiene altas concentraciones de hierro catalítico y lípidos, los cuales se oxidan fácilmente por los radicales libres. Además, el cerebro contiene niveles relativamente bajos de antioxidantes y enzimas de defensa antioxidante, y por lo tanto no es muy eficiente en la eliminación de radicales libres (Mazzetti *et al.*, 2015). Debido a que el cerebro

tiene un alto contenido de lípidos, es extremadamente vulnerable a especies oxidativas, con el consiguiente incremento de la peroxidación lipídica y la oxidación del colesterol, y la subsiguiente formación de productos finales, principalmente 4-HNE y oxisteroles, respectivamente, de los dos procesos (Sottero *et al.*, 2009; Reed, 2011).

Como se muestra en la Figura 11, la disfunción mitocondrial, la acumulación de metales, inflamación y la acumulación de A β son los mecanismos básicos importantes generados por estrés oxidativo (Chen y Zhong, 2014).

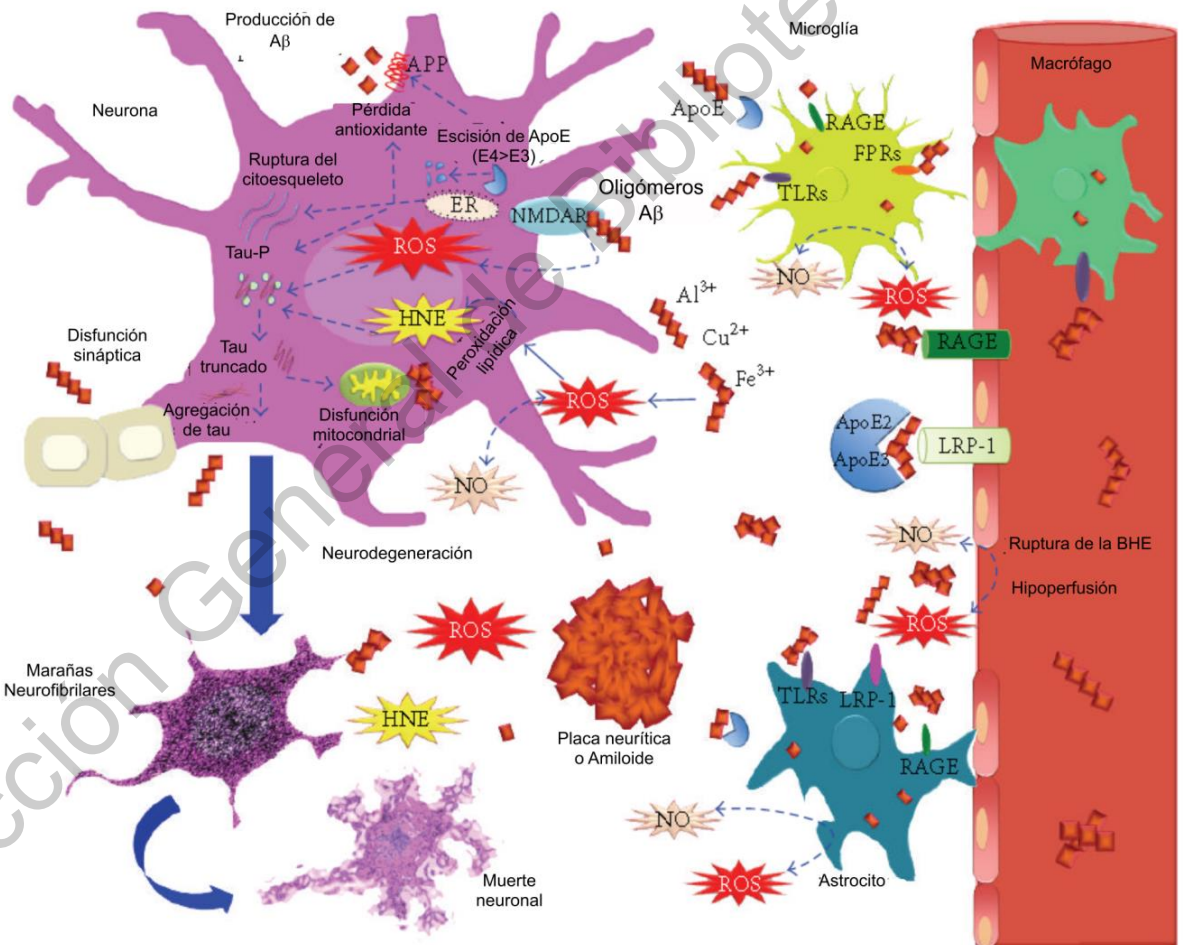


Figura 11. Mecanismos de estrés oxidativo en la EA. Modificado de Luque-Contreras *et al.*, (2014).

2.1.4.2.2. Daño mitocondrial

En todas las células eucariotas, las mitocondrias son los orgánulos responsables de proporcionar la energía necesaria para procesos celulares metabólicos bajo condiciones aeróbicas. En las neuronas, las mitocondrias tienen especial importancia debido a sus altas tasas metabólicas aeróbicas y morfología compleja, además de su papel como proveedor de trifosfato de adenosina (ATP) como una fuente de energía para la liberación y recaptación de neurotransmisores. La función mitocondrial en neuronas es también crucial para el soporte de la maquinaria sináptica, que es considerada un factor limitante de la sinaptogénesis y de la plasticidad neuronal. Adicionalmente, hay una correlación positiva entre la densidad mitocondrial de neuritas y el número de espinas dendríticas (Luque-Contreras *et al.*, 2014).

El daño mitocondrial ha sido observado como una característica de muchas enfermedades neurodegenerativas, aún antes de que aparezcan algunas imágenes y síntomas distintivos de la enfermedad (Luque-Contreras *et al.*, 2014). La disfunción o daño mitocondrial es otra característica de la patogénesis de la EA. Los daños en las mitocondrias generan típicamente defectos en la cadena del transporte de electrones; éstos contribuyen tanto a la hiperproducción de una variedad de ROS, y a la carencia de varias enzimas clave responsables del metabolismo oxidativo que, a su vez, causan daño y muerte celular eventual. Por otra parte, se ha demostrado que las especies oxidativas, a través del deterioro mitocondrial, causan la hiperfosforilación de tau que conduce a la pérdida neuronal y de la sinapsis (Gamba *et al.*, 2015).

El péptido A β es uno de los factores más importantes culpables de la disfunción mitocondrial y que contribuyen a la producción de ROS en la EA (Chen y Zhong . Las funciones mitocondriales que pueden ser afectadas en la EA pueden ser observadas en la Figura 12 y se enlistan a continuación:

- *Disfunción de la cadena de transporte de electrones inducida por A β .* Una de las vías por la cual el péptido A β daña la mitocondria es por disminución de la actividad de enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones. Ha sido reportado que la mitocondria de neuronas de ratones hAPP, la actividad del complejo IV (citocromo oxidasa) y la proporción del control respiratorio se encontraron disminuidas, mientras que el estrés oxidativo, medido como niveles de 4-HNE y peróxido de hidrógeno, incrementaron en comparación con ratones controles (Du *et al.*, 2010). Esto es debido a que el péptido A β es capaz de disminuir la actividad del complejo IV, por unión directa con la subunidad 1 de la enzima citocromo c oxidasa (Luque-Contreras *et al.*, 2014). Además, el péptido A β causa una deficiencia del complejo I (NADH deshidrogenasa), el cual regula la producción de ROS en la mitocondria bajo condiciones fisiológicas normales, y cambios en las funciones de dicho complejo pueden ser responsables de un incremento en la producción de ROS (Bobba *et al.*, 2013).
- *Apertura del poro de transición para la permeabilidad mitocondrial.* La generación elevada de ROS inducida por A β puede promover daños a las mitocondrias mediante la estimulación de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP). MPTP es un complejo de proteína que forma un canal no selectivo que pasa a través de ambas membranas mitocondriales, interna y externa. En condiciones normales, MPTP tiene baja permeabilidad, pero, en algunas condiciones patológicas, su permeabilidad aumenta dramáticamente, lo que conduce a una sobrecarga de calcio intracelular y el estrés oxidativo (Luque-Contreras *et al.*, 2014). Se cree que A β estimula la apertura de MPTP por el aumento de Ca $^{2+}$ intracelular a través de una reducción de la actividad de la ATPasa dependiente de Ca $^{2+}$, además, el Ca $^{2+}$ intracelular altera la organización de los lípidos de la membrana interna mitocondrial mediante la interacción con cardiolipina, el principal fosfolípido de esta membrana. Estas alteraciones pueden afectar la función

de la cadena respiratoria de transporte de electrones, generando así estrés oxidativo y la inducción de la apertura del MPTP (Grijalba *et al.*, 1999).

- *Alteraciones en la dinámica mitocondrial.* Hay pruebas que demuestran que A β también puede tener un efecto en el cambio de tamaño y dinámica mitocondrial, y se cree que el estrés oxidativo también tiene un papel en estas anomalías (Luque-Contreras *et al.*, 2014). Wang *et al.*, (2009) demostró que la expresión de proteínas involucradas en la dimensión y el reciclaje mitocondrial, como la proteína 1 relacionada a la dinamina (Drp1), y proteínas de fusión, incluyendo la proteína 1 de atrofia óptica (OPA1), mitofusina 1 (Mfn1) y mitofusina 2 (Mfn2) se encuentran reducidas, mientras que la expresión génica de la proteína 1 para la fisión (Fis1) se encontró aumentada en hipocampo de pacientes con EA.
- *Creatinina quinasa mitocondrial.* La creatinina quinasa (CK) es una enzima que fosforila a la creatinina por transferencia de un grupo fosfato del ATP para formar fosfocreatinina. Hay cuatro isoformas de CK que se encuentran expresadas en tejidos que demandan altos niveles de energía, como el músculo y el cerebro. En el cerebro, la CK citosólica existe como un homodímero conocido como creatinina quinasa de tipo cerebral. Las mitocondrias de neuronas expresan isoenzimas diméricas y octaméricas (uMtCK) encontradas en el espacio intermembranal. Por lo tanto, el circuito de CK en el cerebro contribuye al manejo del suministro de energía para las funciones neuronales (Luque-Contreras *et al.*, 2014). Una pérdida de uMtCK se ha asociado con anomalías en las conexiones de las fibras musgosas en hipocampo, la reducción de la fase de habituación en el campo abierto, y más lento aprendizaje espacial (Strejgier *et al.*, 2005). La función de CK puede ser alterada en la EA, lo que lleva a los déficits en el mantenimiento de los niveles de energía óptimos y al suministro de energía alterado en células gliales, neuronas y sinapsis (Luque-Contreras *et al.*, 2014).

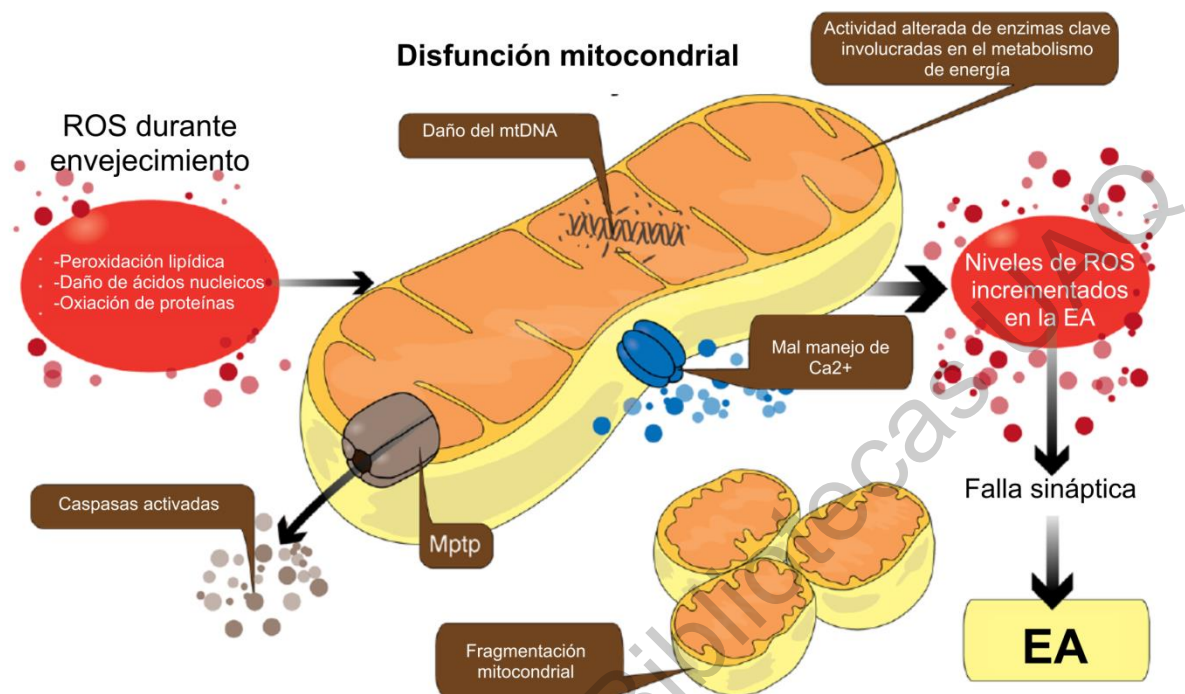


Figura 12. Múltiples procesos patológicos que contribuyen a la disfunción mitocondrial. Modificado de Godoy *et al.*, (2014).

Todos estos puntos demuestran que la disfunción sináptica es una pieza importante en la patología de la EA y representa una proporción significativa de estrés oxidativo inducido $A\beta$, que a su vez, contribuye a procesos inflamatorios y a daños de sistemas de neurotransmisión que conducen a la muerte neuronal.

2.1.4.2.2.3. Neuroinflamación

La microglía, los astrocitos y las neuronas en el cerebro de pacientes con EA expresan y liberan, además de ROS, diversos mediadores neuroinflamatorios incluyendo activadores e inhibidores de la vía del complemento, quimiocinas, citocinas y sistemas de enzimas inflamatorias, los cuales potencialmente contribuyen a la disfunción y eventualmente a la muerte neuronal (Verri *et al.*, 2012). Aunque la inflamación ha sido implicada en la patogénesis de la EA durante muchos

años, la importancia de su papel ha sido cada vez más apreciada en los últimos años. En la EA, la glía constituye un pilar en la inflamación; de hecho, el incremento de la activación glial (tanto astrocitos como microglia) cerca de las placas amiloides se considera otro de los marcadores patológicos.

La microglía, los fagocitos residentes del sistema nervioso central (SNC), se distribuyen de forma ubicua en el cerebro. Las células de microglía utilizan constantemente procesos altamente móviles para inspeccionar la presencia de patógenos y desechos celulares en sus regiones cerebrales asignadas, y proporcionar al mismo tiempo los factores que apoyan el mantenimiento del tejido. Al mismo tiempo, la microglía son células importantes en el mantenimiento y la plasticidad de los circuitos neuronales, que contribuyen a la protección y la remodelación de las sinapsis. Por otro lado, los astrocitos reactivos son caracterizados por un incremento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y por signos de deterioro funcional. Similares a la microglía, los astrocitos liberan citocinas, interleucinas, óxido nítrico y otras moléculas potencialmente citotóxicas después de la exposición a A β , de este modo, exacerbando la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, los astrocitos tienen un potencial rol en la internalización y degradación de A β . ApoE es necesario para el despeje de A β mediado por los astrocitos y la lipidación de ApoE dependiente de astrocitos incrementa la capacidad de la microglía para degradar A β (Heneka *et al.*, 2015).

Junto con la microglia, los astrocitos e incluso las neuronas reaccionan directamente y contribuyen a los cambios neuroinflamatorios crónicos en la EA (Heneka *et al.*, 2010). Tanto la microglía activada y los linfocitos T pueden ser una fuente de producción de citoquinas tales como interleucinas (IL), y el factor de necrosis tumoral (TNF). Entre estas, la IL-1 β y la IL-18 se encuentran aumentadas significativamente en pacientes con EA, así como en las neuronas tratadas con A β y en modelos de ratones transgénicos (Salminen *et al.*, 2008). La inmunorreactividad es principalmente local. Otros han demostrado que la IL-1 β puede inducir la fosforilación de las proteínas Tau y por lo tanto mediar la formación

de MNF. El TNF- α también se ha relacionado con la progresión de la EA, pero su papel es menos claro, ya que el péptido A β puede inducir la secreción de TNF- α que, a su vez, induce la producción de fragmentos A β (Verri *et al.*, 2012).

Además de que los astrocitos y la microglía secretan IL-1 β , IL-18 y TNF- α , en estados avanzados de la enfermedad, se da la producción y secreción de IL-6 e IL-10. La IL-6 es una citocina importante en el SNC y desempeña un papel importante en el cerebro. El gen de la IL-6 está codificado en el cromosoma 7p21 y se ha supuesto que es un buen candidato como factor de riesgo de la EA. Estudios recientes mostraron que polimorfismos en IL-6 están asociados con el riesgo de la EA. A través de un estudio de seguimiento de 10 años en 133 pacientes de edad avanzada, también encontraron que la IL-6 inflamatoria sistémica durante la etapa de agitación es un factor de riesgo para el desarrollo de la EA. En el cerebro de pacientes con EA, la IL-6 estimula y promueve el reclutamiento de la microglia y astrocitos para liberar citocinas pro-inflamatorias, además de que promueve la fosforilación de tau en las neuronas. Teniendo en cuenta la etiología multifactorial de la EA, más estudios caso-control completos de análisis estratificado de diferente exposición, origen étnico u otros factores de riesgo deben llevarse a cabo para evaluar los posibles roles de IL-6 en la patogénesis de la EA en el futuro.

Por otro lado, la IL-10 es una de las principales citocinas anti-inflamatorias y juega un rol importante en la supervivencia celular y homeostasis neuronal. La exposición de células gliales a la IL-10 inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias inducidas por A β . Sin embargo, la estimulación de la IL-10 no suprime la deposición de A β en el cerebro de ratón (Zhang y Liang, 2015). Es por ello que es ineficiente en la degradación de A β 42 y puede potencialmente incrementar la proporción A β 42/A β 40 (A β 42 promueve la deposición amiloide y A β 40 la inhibe) en ratones transgénicos Tg2576, los cuales sobreexpresan APP con mutación en K670/L671 (Kim *et al.*, 2007). Un reciente estudio demostró que la IL-10 periférica se encuentra asociada con la atrofia cerebral en la EA (Leung *et al.*, 2013). Con todo esto, la

relación entre la IL-10 y la EA necesita más evidencia convincente (Zhang y Liang, 2015).

Las neuronas disfuncionales, la microglía activada y los astrocitos por sí mismos liberan una amplia gama de moléculas, que se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de los astrocitos. Estas señales activan vías intracelulares como la de JAK/STAT3, la ruta de NF- κ B, la vía CN/NFAT, o la vía MAPK (Figura 13).

La vía de JAK/STAT3 es activada por interleucinas tales como IL-6 o el factor neurotrófico ciliar (CNTF). Tras la unión de citocinas, la quinasa JAK es activada y STAT3 es reclutada al receptor gp-130. JAK fosforila a STAT3, el cual dimeriza y se transloca al núcleo, donde se une a secuencias específicas (elementos de respuesta a STAT, SRE), en la región promotora de genes blanco. En los astrocitos, la vía JAK/STAT3 regula la transcripción de GFAP, vimentina y la propia STAT3 (Ben Haim *et al.*, 2015).

La vía NF- κ B es activada por citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β . La vía canónica de NF- κ B involucra la activación del complejo IKK por proteínquinas unidas a su receptor, llevando a la fosforilación de I κ B α , el mayor inhibidor de NF- κ B. Tras la fosforilación, I κ B α es poliubiquitinizado y llevado al proteosoma para su degradación. Las subunidades p50 y p65 de NF- κ B entonces son traslocados al núcleo, donde activan la transcripción de varios genes como la óxido nítrico sintetasa inducible y COX2. NF- κ B también induce la transcripción de su inhibidor I κ B α (Ben Haim *et al.*, 2015).

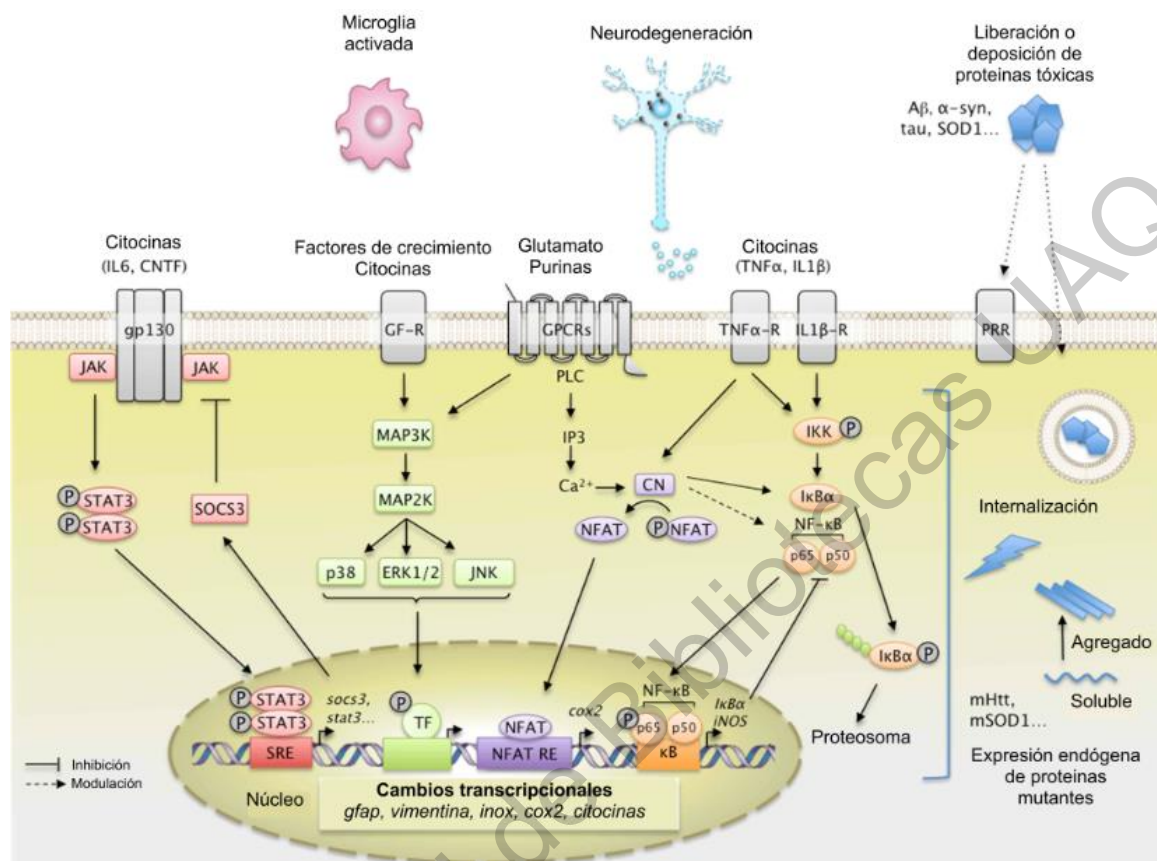


Figura 13. Algunos estímulos extracelulares y rutas de señalización intracelular que conducen a la reactividad de astrocitos en enfermedades neurodegenerativas. Modificado de Ben Haim *et al.*, (2015).

La vía CN/NFAT es activada por citocinas como TNF- α o por glutamato. La calcineurina o CN es una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} con muchos efectos reguladores de la vía NF- κ B dependiendo del funcionamiento inicial y el contexto celular. CN también activa al factor nuclear de células T activadas (NFAT) por desfosforilación. NFAT se une específicamente a secuencias promotoras y activa la expresión de genes blanco (COX2) (Ben Haim *et al.*, 2015).

La vía de MAPK es activada por factores de crecimiento y citocinas que inician una cascada de fosforilación. Tras su activación, ERK1/2, p38 y c-jun también regulan la transcripción de genes a través de la activación de factores de transcripción específicos.

Las enfermedades neurodegenerativas son caracterizadas por la acumulación intra y extracelular de proteínas como A β y tau en la EA. Estas proteínas pueden ser expresadas endógenamente o internalizadas por los astrocitos y representan patrones moleculares asociados al peligro que se unen a específicamente a receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en la membrana o dentro de los astrocitos. Estas proteínas anormales pueden interferir con vías de señalización intracelular, activando o inhibiendo varias proteínas señalizadoras (Ben Haim *et al.*, 2015).

2.1.4.2.2.4. Daño de la función sináptica

Una característica clínica importante de pacientes con EA es la disminución progresiva de la memoria con deterioro inicial de la memoria declarativa corto plazo, seguido de pérdida de múltiples funciones cognitivas. Dado el hecho de que la disfunción sináptica está directamente relacionada con la pérdida de memoria, es importante darse cuenta de que la pérdida sináptica es una característica patológica precoz de la EA (Kim *et al.*, 2014).

La degeneración de las neuronas y la sinapsis en el cerebro de pacientes con EA por lo general se encuentran dentro de las regiones que se proyectan hacia o desde zonas que exhiben altas densidades de placas A β y MNF. Entre las regiones gravemente afectadas se incluyen el hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala, neocorteza y algunas áreas subcorticales, como las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal de rafe y las neuronas no adrenérgicas del locus coeruleus (Selkoe y Schenk, 2003). Hay pruebas de que las neuronas glutamatérgicas que se encuentran en el hipocampo y en las cortezas frontal, temporal y parietal están gravemente afectados, mientras que las mismas neuronas en las cortezas motora y sensorial se encuentran relativamente sin daño (Francis, 2003).

2.1.4.2.2.4.1. Receptores a glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC y se sabe que está involucrado en una variedad de funciones, incluyendo la transmisión sináptica, crecimiento y diferenciación neuronal, plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. El rol del sistema glutamatérgico es convertir los impulsos nerviosos en estímulos químicos por control de la concentración de glutamato en la sinapsis (Revett *et al.*, 2013).

Desde que se sabe que el hipocampo y la corteza son esenciales para el aprendizaje y la memoria, es posible que la degeneración de las neuronas glutamatérgicas pueda ser un evento temprano en la patogénesis de la enfermedad. Hay pruebas de que las neuronas glutamatérgicas se encuentran en el hipocampo (Revett *et al.*, 2013). Un estudio llevó a cabo la investigación de los cambios en el sistema glutamatérgico y demostró mayor correlación entre la reducción de la densidad glutamatérgica en el botón presináptico y los déficits cognitivos distintos al de las MNF o de las placas A β , tal como se determinó mediante la comparación del puntaje obtenido por el mini examen del estado mental en individuos sanos con el puntaje de individuos con EA leve o grave. Curiosamente, el estudio también encontró que hubo aumento en las sinapsis glutamatérgicas en individuos con deterioro cognitivo leve, lo que sugiere que puede haber un evento compensatorio inicial que ocurre en el cerebro de estas personas que decae con progresión de la enfermedad (Bell *et al.*, 2007).

Las neuronas piramidales de la corteza que utilizan el glutamato como su transmisor primario se sabe que poseen receptores colinérgicos y glutamatérgicos y reciben aferencias de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Existe evidencia de que los inhibidores de acetilcolinesterasa pueden promover la liberación de glutamato de las neuronas piramidales, posiblemente por el aumento de los niveles de acetilcolina corticales y la posterior activación de los receptores colinérgicos (Revett *et al.*, 2013). Estos resultados proveen las bases neuroquímicas de las

interacciones entre los sistemas colinérgico y glutamatergico y sus aplicaciones sobre las anomalías patológicas de la EA.

En las neuronas presinápticas, los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 y VGLUT2, mantienen el nivel de glutamato almacenado en vesículas, y cuando una neurona es despolarizada, el glutamato es liberado en la hendidura sináptica donde este se une a receptores de neuronas pre- y postsinápticas (Figura 14) (Revett *et al.*, 2013).

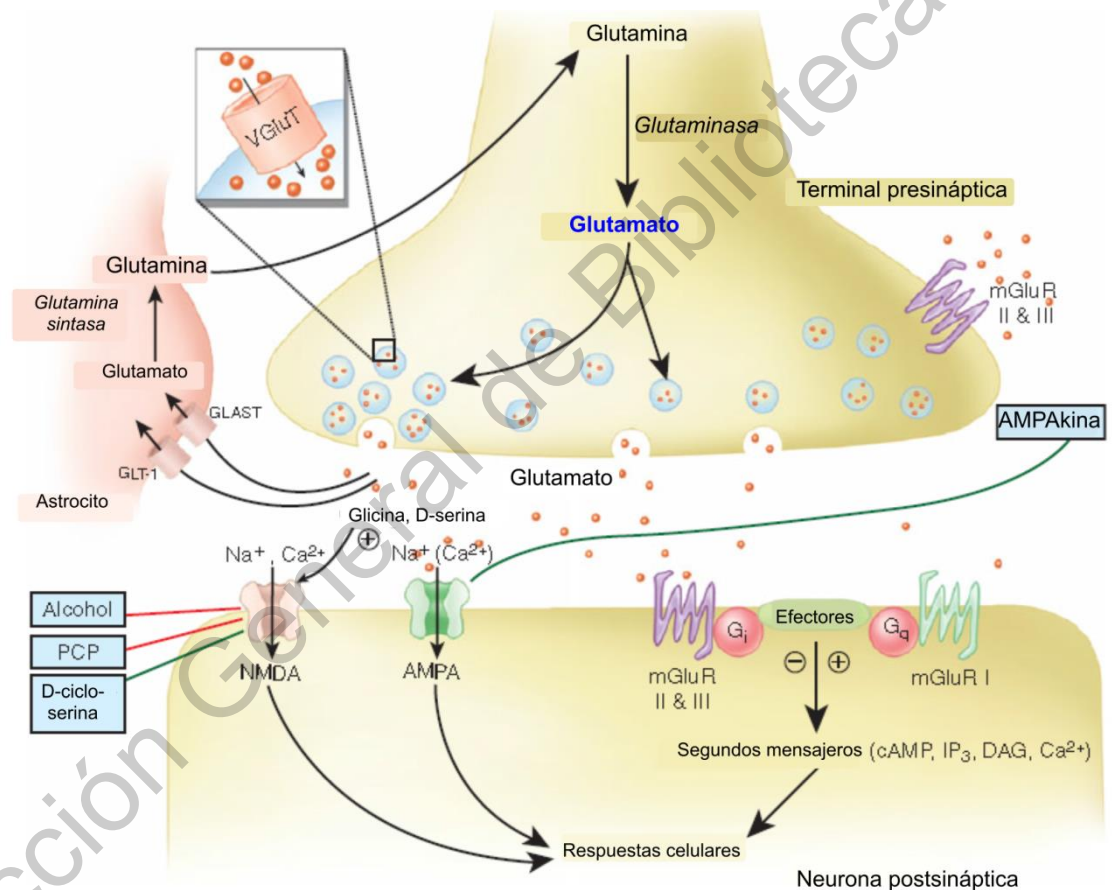


Figura 14. Sinapsis excitatoria típica a través de glutamato y sus diferentes tipos de receptores. Modificado de Nestler *et al.*, (2009).

Existen dos familias de receptores a glutamato localizados en la membrana plasmática de las neuronas, los receptores a glutamato ionotrópicos (iGluR) y metabotrópicos (mGluR). La familia de receptores iGluR está ampliamente dividida

en tres clases, las cuales están basadas en agonistas específicos y la permeabilidad a diferentes cationes; los receptores NMDA (NR1, NR2A-D y NR3A-B), que son predominantemente permeables a Ca^{2+} , mientras que los receptores a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y los de kainato, son predominantemente permeables a Na^+ y K^+ (Kew y Kemp, 2005). A la fecha, hay 8 receptores a glutamato metabotrópicos acoplados a proteína G, que están clasificados de acuerdo a su estructura y función fisiológica en tres distintos grupos como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Clasificación de los receptores a glutamato metabotrópicos

Grupo	Proteína G	Segundo mensajero	Subtipo de Receptores	Localización del subtipo
1	G_q/G_{11}	PLC/ Ca^{2+}	mGluR1 mGluR5	Neuronas postsinápticas (NPoS) NPoS, astrocitos reactivos y microglía
2	G_i/G_o	AC	mGluR2 mGluR3	Neuronas presinápticas (NPrS) y NPoS NPrS, NPoS, astrocitos y microglía
3	G_i/G_o	AC	mGluR4 mGluR6 mGluR7 mGluR8	NPrS, astrocitos y microglía Sólo en la retina NPrS NPrS y microglía

Fuente: Revett *et al.*, (2013).

Asimismo, la liberación al espacio intersináptico de varios neurotransmisores, principalmente glutamato, es modulada por otro tipo de receptores, los adenosinérgicos (Detlev, 2008). La adenosina neuromoduladora cumple un papel único en el cerebro que afecta la neurotransmisión glutamatérgica y la señalización dopaminérgica a través de la activación de los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} , respectivamente. El sistema de adenosina está por lo tanto en una posición ideal

para integrar la neurotransmisión glutamatergica y dopaminérgica, que a su vez podría afectar el comportamiento y la cognición (Detlev, 2011). Por otro lado, dichos receptores forman dímeros entre ellos y dependiendo de la concentración de adenosina en el medio modulan la liberación de glutamato, como se muestra en la Figura 15. Del mismo modo estos receptores a adenosina forman dímeros con receptores a glutamato, como lo son los mGluR1 y mGluR5, modulando procesos excitatorios (Ciruela *et al.*, 2011).

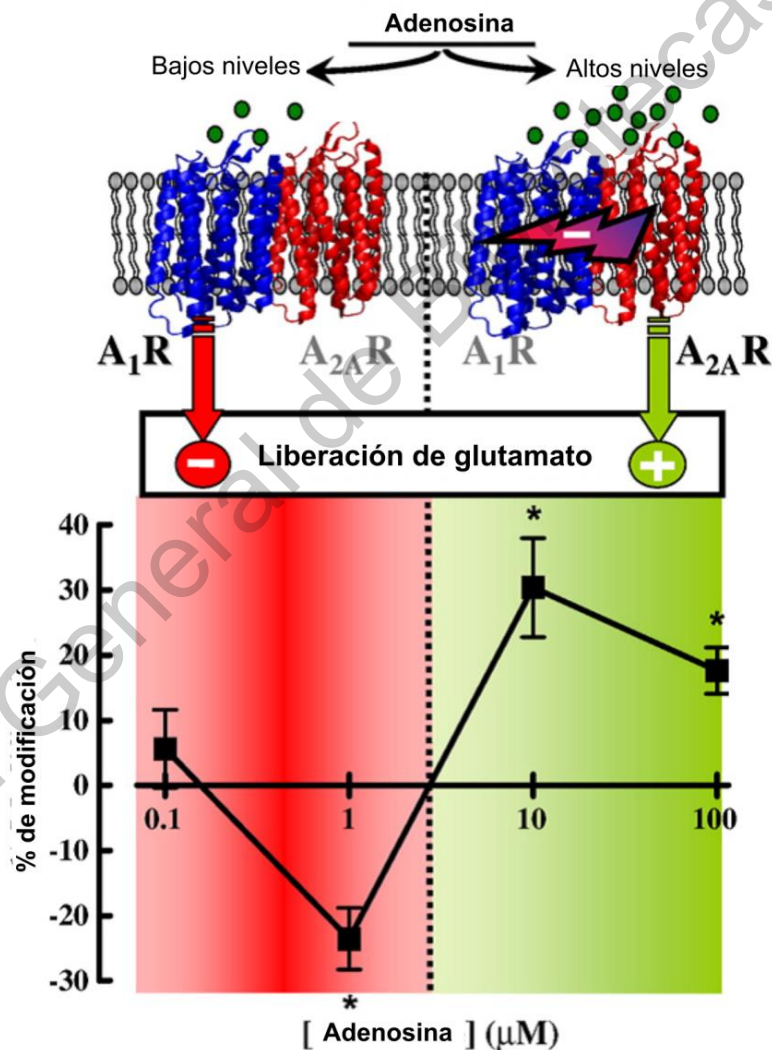


Figura 15. Esquema del complejo heterotrimérico de los receptores de adenosina dependientes de concentración para la modulación o daño del sistema glutamatergico. Modificado de Ciruela *et al.*, (2011).

2.1.4.2.2.4.1.1. mGluR5

El receptor mGluR5 es un receptor transmembranal acoplado a proteína G. Hay 3 isoformas diferentes, mGluR5a, mGluR5b y mGluR5d (Malherbe *et al.*, 2002). En las neuronas postsinápticas los receptores mGluR5 están unidos físicamente a la subunidad NR2 de los receptores NMDA a través de una cadena de proteínas de interacción postsináptica, incluyendo PSD-95, Shank y Homer. La activación de los receptores mGluR5 incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular potenciando la estimulación de la proteína quinasa C (PKC). Los receptores mGluR5 principalmente muestran una localización peri-sináptica de la membrana postsináptica de las neuronas glutamatérgicas, donde frecuentemente regulan la excitabilidad neuronal por modulación de las corrientes a través de iGluR. Los receptores mGluR5 se encuentran localizados en neuronas y células gliales de todo el SNC, incluyendo la corteza y el hipocampo (Kumar *et al.*, 2015).

Se ha hipotetizado que los oligómeros de A β ejercen sus efectos sinaptotóxicos a través de los receptores NMDA, que es conocido por ser los primeros síntomas de la disfunción cognitiva en la EA. La memantina, un antagonista no competitivo del receptor NMDA, y un medicamento aprobado por la FDA para la EA es conocido para retardar la progresión de la EA de moderada a severa (Lipton, 2007). Sin embargo, el bloqueo completo del receptor NMDA también puede conducir a la pérdida de memoria (Kumar *et al.*, 2015).

Dado que los receptores mGluR5 están altamente expresados en la corteza cerebral y en regiones del hipocampo, se puede suponer que mGluR5 puede tener un papel importante en la disfunción relacionada con trastornos cognitivos del cerebro como la EA. Se ha sugerido que la expresión neuronal de mGluR5 es requerida para varias funciones fisiológicas, en interacción con los receptores NMDA; posiblemente a través del complejo proteico Homer/PSD95/Shank (Won *et al.*, 2012). Sin embargo, mientras que la expresión constitutiva de mGluR5 es necesaria para mediar la plasticidad sináptica a través de los receptores NMDA, la sobreexpresión

de mGluR5 puede posiblemente desencadenar la vía de señalización río abajo neurotóxica que puede conducir a la muerte celular (D'Antoni *et al.*, 2011). Además, el bloqueo farmacológico o la alteración genética de mGluR5 conduce a efectos neuroprotectores (Hamilton *et al.*, 2014). Además, también se ha demostrado que el uso de antagonistas del receptor mGluR5 demostraron ejercer neuroprotección contra la degeneración excitotóxica (Movsesyan *et al.*, 2001) así como en la toxicidad inducida por A β en cultivos corticales (Bruno *et al.*, 2000).

2.1.4.2.2.4.1.1.1. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es causada por el exceso de la activación de los receptores a glutamato (principalmente los receptores NMDA) potenciando la sobrecarga de Ca²⁺ intracelular, llevando a la muerte celular. La localización subcelular de los receptores de glutamato es funcionalmente importante en la neurotoxicidad por glutamato como se ha demostrado que los receptores a NMDA sinápticos y extrasinápticos tienen funciones fisiológicas opuestas; la estimulación de los receptores ubicados sinápticamente lleva a la activación de rutas de supervivencia, mientras que la estimulación de receptores extrasinápticos, debido a un exceso de glutamato, resulta en la activación de rutas de muerte celular. El exceso de la señalización glutamatérgica ha sido implicada en la progresión de muchas enfermedades neurodegenerativas, por lo que la focalización en esta neurotransmisión defectuosa podría prevenir la estimulación excesiva del receptor y su daño asociado (Williams y Dexter, 2014).

En la EA, se cree que la estimulación glutamatérgica excesiva conduce a la degeneración progresiva de regiones cerebrales selectivas corticales y del hipocampo a través de la excitotoxicidad. Anormalidades en la expresión de receptores iGlu, junto con la eliminación alterada de glutamato de la hendidura sináptica por la glía son evidentes en EA, modificando significativamente funciones de señalización y sinapsis (Francis *et al.*, 2012).

La activación recurrente y prolongada de los receptores NMDA extrasinápticos se ha relacionado con el aumento en los niveles del péptido A β a través de la producción incrementada de la expresión de APP amiloidogénica, la característica principal del incremento en las placas A β en la EA (Bordji *et al.*, 2010).

2.1.5. Tratamientos actuales de la EA

Debido a que la EA es tan incapacitante y hoy en día es más común, intensos esfuerzos de investigación en la industria farmacéutica y en el ámbito académico se han dedicado a desarrollar agentes para impedir o retrasar el proceso patológico de la enfermedad. Actualmente los fármacos utilizados se centran en la mejora sintomática única e incluyen fármacos que aumentan la neurotransmisión colinérgica o bloquean los receptores a glutamato. Aún en desarrollo, hay varias estrategias encaminadas a alterar procesos de la propia enfermedad, tales como la regulación de A β o tau (Nestler *et al.*, 2009). Los fármacos mencionados anteriormente para el tratamiento de la EA se encuentran clasificados de la siguiente manera:

- *Agentes colinérgicos.* Debido a que las neuronas colinérgicas de los núcleos basales son prominentemente afectadas en la EA, y a que la actividad colinérgica regula procesos de memoria, el aumento del funcionamiento colinérgico fue uno de los primeros blancos terapéuticos. Los primeros intentos para incrementar el funcionamiento colinérgico involucró la administración de los precursores de acetilcolina, la colina y la lecitina. Aunque la estrategia análoga ha demostrado ser eficaz en otras patologías como la enfermedad de Parkinson, múltiples estudios han establecido que los precursores colinérgicos no son efectivos en el tratamiento de la EA. Los esfuerzos posteriores se reunieron con éxito parcial mediante la inhibición de la actividad de la colinesterasa que despeja la acetilcolina de la hendidura sináptica. Cuatro inhibidores de la colinesterasa están aprobados

actualmente para el tratamiento de la EA: tacrina, donepezilo, galantamina y rivastigmina. Estos agentes no invierten el curso de la enfermedad, ni son más eficaces en la restauración de la función cognitiva, pero en algunos pacientes pueden retrasar temporalmente el inevitable deterioro sintomático. Además, los receptores de neurotransmisores colinérgicos son objetivos potenciales de agentes medicinales, ya que tanto los receptores muscarínicos M_1 y nicotínicos $\alpha 7$ modulan los efectos patogénicos de la APP/A β . El receptor $\alpha 7$ se encuentra altamente enriquecido en el hipocampo, y varios agonistas de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ selectivos están en los primeros ensayos clínicos como potenciadores cognitivos en la EA.

Otras estrategias de tratamiento colinérgicos incluyen las vías de señalización del factor de crecimiento nervioso, que proporciona soporte trófico para las neuronas colinérgicas. Sin embargo, es un reto depositar los factores de crecimiento directamente en el cerebro y diseñar pequeñas moléculas que activen vías de señalización del factor de crecimiento endógeno, y no hay evidencia hasta la fecha de que este enfoque funciona clínicamente (Nestler *et al.*, 2009).

- *Antagonistas del receptor NMDA.* Además de los inhibidores de la colinesterasa, el otro tratamiento aprobado para la EA es la memantina. La memantina es un antagonista de baja afinidad del receptor de glutamato NMDA, que está integralmente involucrado en la plasticidad sináptica pero, también media el daño excitotóxico como se discutió anteriormente. Debido a sus efectos son voltaje-dependientes, se ha propuesto que la memantina inhibe preferentemente la activación excesiva del receptor de NMDA asociados con la excitotoxicidad, sin bloquear la función del receptor bajo la mayoría de condiciones normales (Nestler *et al.*, 2009).
- *Agentes anti-inflamatorios y antioxidantes.* La formación de placas A β causa activación microglial y astrocítica, junto con la liberación de citocinas

proinflamatorias y proteínas de fase aguda. Por lo tanto, los procesos inflamatorios están implicados en la neurodegeneración que es característica de la EA. De acuerdo con esto, los estudios epidemiológicos retrospectivos sugieren que los pacientes que toman medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, el ibuprofeno, que es tomado por pacientes con artritis, disminuye el riesgo de desarrollar la EA. Una estrategia de tratamiento relacionado implica el uso de antioxidantes y captadores de radicales libres. Cuando células de la microglia están activadas secretan peróxido de hidrógeno, superóxidos y radicales hidroxilo; éstos son útiles en la lucha contra organismos exógenos pero pueden dañar las neuronas. Por lo tanto, es posible que los antioxidantes y captadores de radicales libres pueden tener función protectora en la EA y en otras enfermedades neurodegenerativas. La vitamina E (α -tocoferol) ha sido extensamente estudiada (Gugliandolo *et al.*, 2017).

2.1.5.1. Moléculas propuestas para el tratamiento de la EA

2.1.5.1.1. Cafeína

La cafeína es el compuesto neuroactivo más consumido en el mundo y puede ser sintetizada por un gran número de plantas, incluyendo el café, el té y el maté (Ashihara *et al.*, 2008). La cafeína por sus propiedades antioxidantes (Zeidán-Chuliá *et al.*, 2015) y por sus diversos mecanismos de acción en enfermedades neurodegenerativas, el comportamiento y aprendizaje y memoria (Mustard, 2014), se ha propuesto como molécula activa en la EA. Los principales efectos farmacológicos de la cafeína, se deben ampliamente a su similitud estructural con la adenosina, incluyendo la inhibición de las fosfodiesterasas (PDE), la regulación intracelular de los niveles de calcio, y el antagonismo de los receptores de adenosina (Chen y Chern, 2011; Johnson *et al.*, 2012). Estas acciones primarias resultan en efectos fisiológicos como estimulación del SNC. Además, la cafeína

también puede presentar otros procesos periféricos como la relajación de músculo liso o estimular la diuresis y la contracción muscular. La cafeína es mayoritariamente metabolizada por el hígado e, interesantemente, uno de sus metabolitos es la teobromina (Martínez-Pinilla *et al.*, 2015).

Con respecto avances en la patología de la EA se ha observado que la administración de cafeína a largo plazo suprime o disminuye la generación de fragmentos A β en plasma y en cerebros de animales transgénicos (Cao *et al.*, 2009).

2.1.5.1.2. Teobromina

La teobromina y la cafeína son moléculas químicas que pertenecen a la familia de las metilxantinas y que tienen en común un núcleo de xantina correspondiente a la adenosina, además de que la teobromina se encuentra mayoritariamente en el árbol de cacao. El árbol de cacao (*Theobroma cacao L.*) es originario de los bosques tropicales de América Central y de los ecuatoriales de América del Sur. Se cultiva a uno y otro lado del ecuador en el oeste de África. Éste árbol se caracteriza porque sus flores se encuentran insertadas directamente en el tronco y en las ramas de mayor grosor y por sus muy típicos frutos. La almendra de la semilla de cacao contiene aproximadamente un 50% de lípidos (manteca de cacao), los cuales están constituidos por un 75% de triacilgliceroles simétricos que poseen un ácido oleico en posición 2. La composición en ácidos grasos varía poco según el origen geográfico: saturados en C₁₆ (25-29%) y C₁₈ (32-37%) e insaturados en C_{18:1} (33-37%). Se señala la presencia de compuestos fenólicos, flavan-3-oles, procianidoles B-1, B-2, B-6, C-1 y oligómeros. La oxidación de estos polifenoles en el curso de la fermentación explica el color característico de los compuestos. Las metilxantinas se encuentran representadas por la teobromina (mayoritaria: 1-3%) y la cafeína (0.05-0.3%) (Bruneton, 2001).

Se ha demostrado que la teobromina tiene varios efectos benéficos. En enfermedades respiratorias como la tos, la teobromina parece estar relacionada con su potencial efecto anti-inflamatorio, así como con la modulación de la reactividad de las vías respiratorias (Mokry *et al.*, 2009). Los inhibidores no selectivos de fosfodiesterasa son eficaces en la supresión de la hiperreactividad en vías respiratorias.

Por otro lado, recientemente, Sugimoto *et al.*, (2014) demostraron que el potencial efecto antitumoral de la teobromina en la proliferación de glioblastoma maligno resultó de la regulación de la fosfodiesterasa 4 (PDE4), la proteína quinasa B, y por p38 MAPK y NFκB reguladas por señales extracelulares. Actuando como inhibidores de la fosfodiesterasa, las metilxantinas son capaces de regular negativamente citoquinas proinflamatorias tales como el interferón-gamma o el factor de necrosis tumoral alfa (Harris *et al.*, 2010).

Otros trabajos que evaluaron los efectos de la teobromina independientes de los receptores de adenosina han sido demostrados en la protección cardiovascular por un incremento significativo en los niveles plasmáticos de colesterol HDL y una disminución en los niveles de LDL (Khan *et al.*, 2012).

Fernández-Fernández *et al.*, en 2015 evaluaron y compararon el efecto antioxidante de la teobromina con una dieta enriquecida en teobromina, polifenoles y ácidos grasos poliinsaturados en células SH-SY5Y lesionadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y observaron que hubo incremento en los niveles proteicos de las enzimas antioxidantes SOD-1 y glutatión peroxidasa en ambos tratamientos.

En trabajos anteriores, realizados por nuestro grupo de trabajo, se observó que la teobromina, a una concentración administrada en el agua de 30 mg/L tuvo efectos neuroprotectores al disminuir los niveles de Aβ₄₂, mejora los procesos cognitivos y de memoria y modula la expresión del receptor purinérgico A₁ en el encéfalo de un modelo animal propuesto para la EA a través de una dieta elevada en grasas (Mendiola-Precoma *et al.*, 2017), sin embargo, se desconocen sus mecanismos.

Con todo esto y debido a que la teobromina tiene similitud estructural y capacidades funcionales iguales o mejores que la cafeína, se propone a la teobromina como molécula neuroprotectora para la prevención de enfermedades neurodegenerativas, principalmente la EA, así como el retraso del avance de la enfermedad de tipo genético.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

3. JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento demográfico es un proceso de alcance mundial que demuestra los éxitos de los avances en asistencia sanitaria a lo largo del siglo pasado. Muchas personas viven ahora más tiempo y con un estilo de vida más saludable y por ello la población mundial tiene una mayor proporción de personas de edad avanzada. Todos estamos de acuerdo en que el envejecimiento trae consigo algunos retos. Un efecto claramente negativo del envejecimiento es el incremento significativo en el número de personas con la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias relacionadas. El Informe Anual de 2015 sobre la EA confirma que existen millones de personas que la padecen. Este Informe y todos los anteriores estudios indican que se espera que el número actual de personas que sufren demencia aumente a una velocidad alarmante.

La EA puede aparecer asociada con otras enfermedades, de las cuales algunas se consideran, en la actualidad, como factores de riesgo de la propia EA, tales como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la depresión, algunas cardiopatías, la menopausia, la enfermedad multiinfarto y/o demencia vascular, por citar solo algunas. En la actualidad, se da mucha importancia al síndrome metabólico por las graves consecuencias que ocasiona, con grave deterioro de la calidad de vida del paciente a través de los problemas relacionados con la diabetes, la hipertensión arterial y la hipercolesterolemia. En México, éste es uno de los problemas prioritarios de salud, ya que se informa una incidencia cercana a 26%, con pacientes diabéticos del 30% y el 30% de pacientes con hipertensión arterial, lo cual indica que existe un riesgo alto de que a corto plazo la EA ocasione estragos dentro de la población mexicana, dado que entre los adultos mayores la incidencia de la diabetes es de 40%.

Para el tratamiento de la enfermedad, que existen diversos, la galantamina y la rivastigmina (un derivado sintético de la fisostigmina) son inhibidores de la colinesterasa y están aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA; ambas

moléculas son alcaloides. Los alcaloides son una clase de compuestos de origen natural que contienen nitrógeno orgánico y se encuentran principalmente en las plantas, especialmente en ciertas familias de plantas con flores. Asimismo las metilxantinas, que también pertenecen a la gran familia de los alcaloides, han demostrado tener efecto neuroprotector en la EA, principalmente la cafeína. Sin embargo, la cafeína tiene efectos secundarios como el insomnio y la ansiedad, es por eso que se buscan otras alternativas para la prevención de la enfermedad. En estudios previos se demostró que la teobromina, una molécula perteneciente a la misma familia de las metilxantinas, generó efecto neuroprotector en ratas con EA de tipo esporádico inducida por dieta alta en grasas, además de que ya se conoce que uno de los metabolitos de la cafeína en el organismo es la propia teobromina y que genera menos efectos secundarios que la cafeína. Con esto, se propone que la teobromina potencializa el almacenamiento de memoria y de los procesos cognitivos y la disminución en la formación de placas amiloides a través de mecanismos relacionados a la enfermedad y anti-inflamatorios.

4. HIPÓTESIS

Los mecanismos por los cuales la teobromina genera neuroprotección en un modelo de Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádica inducida por dieta están asociados a la regulación de marcadores neuropatológicos y neuroinflamatorios.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar los mecanismos involucrados en la neuroprotección generada por teobromina en un modelo de enfermedad de Alzheimer de tipo esporádica inducida por dieta enriquecida en manteca de cerdo.

5.2. Específicos

- Evaluar el efecto de la teobromina sobre la distribución de péptidos y placas A β en el encéfalo de un modelo de rata con EA de tipo esporádica por la técnica de inmunohistoquímica.
- Determinar el efecto de la teobromina sobre la expresión de péptidos y placas A β en el encéfalo de un modelo de rata con EA de tipo esporádica mediante la técnica de *Western Blot*.
- Evaluar el efecto de la teobromina sobre los niveles totales de la proteína tau y proteína tau fosforilada (Ser262) en el encéfalo de un modelo de rata con EA de tipo esporádica por *Western Blot*.
- Comparar el efecto de la teobromina sobre los niveles de APP, α -, β - y γ -secretasas en el encéfalo de un modelo de rata con EA de tipo esporádica por *Western Blot*.
- Analizar el efecto de la teobromina sobre procesos inflamatorios mediante la cuantificación de IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- α en el encéfalo de un modelo de rata con EA de tipo esporádica por la técnica de ELISA.
- Determinar las interacciones de la teobromina con el receptor purinérgico A_{2A}R mediante técnicas computacionales.

6. METODOLOGÍA

6.1. Equipos

- Laberinto elevado de 8 brazos (longitud de cada brazo = 50 cm, ancho de cada brazo = 14 cm, diámetro del eje central de 40 cm, altura de las paredes de 40 cm, con base del piso al laberinto de una altura de 50 cm)
- Campo abierto (1.5 x 1.5 m de base y 40 cm de altura)
- Fuente de poder
- Microscopio confocal Zeiss LSM 700.
- Espectrofotómetro UV/Visible Ultraspec 3300 pro Amersham Biosciences®
- Lector de ELISA BioRad 680

6.2. Material

- Cilindros de distintos colores y tamaños
- Micropipetas
- Membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences®)

6.3. Reactivos

- Teobromina
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Revelador de placas fotográficas Carestram Dental®
- Fijador de placas fotográficas Kodak®
- Anticuerpos primarios
- Anticuerpos secundarios

6.4. Animales y tratamiento

El manejo, almacenamiento y eutanasia de los animales se hicieron de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se utilizaron 3 grupos de 20 ratas de la cepa *Wistar* cada grupo bajo las siguientes condiciones: (6 meses de edad, alimento y agua ad libitum, y ciclos de luz/oscuridad de 12/12h).

Los grupos fueron los siguientes: grupo 1: ratas alimentadas con dieta normal, grupo 2: ratas alimentadas con dieta enriquecida con manteca de cerdo al 33% (DEG), grupo 3: ratas alimentadas con dieta enriquecida con manteca de cerdo al 33% y 30 mg de teobromina/día (DEG+TB). Todos los grupos fueron mantenidos por sus respectivas dietas y tratamiento con teobromina durante 6 meses.

6.5. Pruebas cognitivas y de memoria

Cada uno de los animales de los tres grupos fueron sometidos a pruebas cognitivas y de memoria a través del laberinto radial de 8 brazos y la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, como se realizaron en trabajos previamente estandarizados (Mendiola-Précoma *et al.*, 2015).

Para la prueba de laberinto elevado de 8 brazos, se utilizó el laberinto radial de 8 brazos. La prueba se hizo en un periodo de 5 meses después de la dieta y consistió en 2 sesiones de 2 pruebas cada sesión por día. Para analizar la memoria espacial de los animales, se utilizaron figuras representativas en las entradas de los brazos del laberinto, las cuales fueron cilindros de diferentes tamaños y colores (amarillo, azul, rojo, verde y naranja). El test consistió en tres fases: fase de habituación, fase de entrenamiento y fase de prueba. Antes de empezar el test los animales tuvieron que adaptarse al laberinto montado. Para esto, se hizo una fase de prehabituación durante los primeros 15 días de administración de las correspondientes dietas y tratamientos, ésta consistió en dejar cada rata por 5 minutos en el laberinto en dos

días diferentes. Para cada sesión de cada una de las fases del experimento, incluyendo la fase de prehabituación, los animales fueron privados de agua por 24 horas antes de llevar a cabo la observación. Cada sesión tuvo como máximo una duración de 5 minutos para que el animal encontrara su recompensa (bebedero con agua).

Para montar el experimento, se puso un bebedero con agua en 2 de los brazos del laberinto, los 5 cilindros mencionados anteriormente fueron colocados en la entrada de 5 brazos diferentes, incluyendo el brazo que contenía la recompensa, procurando siempre que cada cilindro identificado por color fuera colocado en su respectivo brazo; para eliminar interferencias de cualquier olor ajeno al experimento, entre pruebas de diferentes ratas, se hizo limpieza de todo el laberinto con solución desinfectante y posteriormente con etanol al 70%. Antes de empezar la fase de habituación al primer mes de tratamiento, los animales fueron privados de agua un día antes de la prueba. Durante la prueba se monitoreó el tiempo que tardaban los animales en encontrar la recompensa, el número de entradas totales a los brazos del laberinto, entradas a brazos correctos (brazos con recompensa), entradas a brazos incorrectos (brazos sin recompensa), y el número de veces que tomaron la recompensa, durante 5 minutos. Los animales nuevamente fueron examinados el mismo día otra vez con un periodo de descanso de 60 minutos entre pruebas de cada sesión. La otra sesión de la fase se hizo al tercer día. Para las fases de entrenamiento y de prueba, se realizó exactamente el mismo procedimiento, solo que la primera fue llevada a cabo al tercer mes de tratamiento, y la segunda al quinto mes de tratamiento.

Con respecto a la prueba de índice de reconocimiento de objeto nuevo, fue llevada a cabo 24 horas después de la habituación al aparato de campo abierto. La habituación al campo abierto consistió en dejar al animal durante 5 minutos en el campo abierto. El aparato fue hecho de madera Triplay y pintado de blanco; sus medidas fueron de 1.5 x 1.5 m y fue rodeado por una pared de 50 cm de altura. Primero, los animales realizaron una sesión de entrenamiento, la cual consistió en

colocar dos objetos idénticos (A1 y A2) cerca de dos esquinas de cualquier lado de la cámara. Las ratas fueron colocadas individualmente en el campo abierto haciendo que la rata viera la pared opuesta y siguiendo a que la rata explorara los objetos por 5 minutos. La sesión de prueba fue llevada a cabo 90 minutos después de la sesión de entrenamiento, y ahora dos objetos diferentes (A3 y B1) fueron colocados en la misma posición que en la sesión de entrenamiento, un objeto familiar (el mismo que la sesión de entrenamiento) y un objeto nuevo. La exploración de los objetos fue definida cuando el animal acercaba la nariz a cualquiera de los dos objetos a una distancia de al menos 2 cm y/o que tocara el objeto con la nariz o las patas. Las alertas sobre el objeto no fueron consideradas como comportamiento exploratorio. El índice de reconocimiento de objeto nuevo fue definido como: $TN/(TN + TF)$, [TN = veces que el animal exploró el objeto nuevo; TF = veces que el animal exploró el objeto familiar] y fue realizado al tercero y cuarto mes de tratamiento. Para cada prueba fueron utilizados objetos diferentes.

Pasados los 5 meses de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas de acuerdo a principios de bioética. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico 40 mg/Kg vía intraperitoneal previo al sacrificio. Se extrajeron los encéfalos y se disecaron el hipocampo, la corteza frontal y el resto de la corteza; éstos fueron almacenados a -80°C para su uso en técnicas posteriores.

6.6. Medición de los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre

Los cambios en el peso y los niveles de colesterol y triglicéridos se evaluaron a lo largo del tratamiento. La medición de los niveles de colesterol y triglicéridos se llevaron a cabo por triplicado al primer, tercer y quinto mes de tratamiento. Se ocupó suero mediante la extracción sanguínea caudal por punción, y la medición de colesterol y triglicéridos se midieron con el equipo de tiras reactivas Accutrend® GCT.

6.7. Inmunohistoquímica

Los animales que fueron utilizados para inmunohistoquímica se anestesiaron con pentobarbital sódico y se perfundieron con *p*-formaldehído antes de la extracción del encéfalo. Para la inmunohistoquímica se utilizaron los encéfalos de cuatro animales por grupo, y éstos fueron disectados en corteza frontal, área del hipocampo, y cerebelo.

6.7.1. Fijación de tejidos

El tejido se colocó en para-formaldehído (PFA) al 4 % en *buffer* de fosfatos salinos (PBS) durante el tiempo que fue determinado en estudios preliminares a 4 °C.

6.7.2. Crioprotección de tejidos

Pasados los 30 minutos de fijación, los tejidos se enjuagaron con PBS 1X, y se colocó en una solución de sacarosa al 30% en PBS para su crioprotección. Posteriormente, se montaron los tejidos en cajas de papel aluminio con medio congelador de tejidos Jung y fueron conservadas a -70°C.

6.7.3. Cortes del tejido

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

6.7.4. Inmunofluorescencia

Se seleccionaron las laminillas previamente preparadas. Se colocaron en una cámara húmeda con tapadera y se le realizaron 3 lavados con PBS 1x de 10 minutos cada lavado a todas las laminillas. Por cada lavado se escurrieron las laminillas para agregar el siguiente lavado, y con cuidado de no soltar tejido.

Pasados los tres lavados, a cada laminilla se le agregaron 300 μ l del tratamiento bloqueador de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% y se dejarán incubar 3 horas. Se retiró el bloqueo y se hicieron 3 lavados con PBS 1x para posteriormente agregar los anticuerpos primarios que se mencionan en el Cuadro 6 y dejar incubar toda la noche.

Cuadro 6. Anticuerpos que serán utilizados para la inmunofluorescencia

ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
Anti-A β rabbit	Alexa Flúor 568 anti-rabbit

Al día siguiente se retiraron los anticuerpos primarios, se hicieron tres lavados con PBS 1X y se agregaron los anticuerpos secundarios, como se muestra en el cuadro 6, dejando incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se retiraron los anticuerpos secundarios y se hicieron tres lavados con PBS, para finalmente fijarlos con una gota de glicerol y observarlos al microscopio de fluorescencia.

6.8. Semicuantificación de APP, α -, β - y γ -secretasas, péptido y placas A β , proteína tau y proteína p-tau (Ser-262) por *Western Blot*

Se evaluó la expresión de las proteínas APP, α -, β - y γ -secretasas, péptido y placas A β , así como de la proteína tau y la proteína p-tau (Ser-262) mediante la técnica de *Western Blot*, la cual permite la detección de la proteína de interés dentro de una mezcla compleja de otras proteínas debido a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo, con el fin de obtener datos cualitativos y semicuantitativos.

6.8.1. Extracción de proteínas a partir de tejido

En el caso de ratas, se separó la corteza frontal de cada uno de los encéfalos de las ratas controles y tratadas; en condiciones asépticas y fueron congelados a -70

°C hasta su utilización. Para su extracción se lisó el tejido y se agregó amortiguador de lisis adicionado de los inhibidores de proteasas, a razón 1:5 (tejido:amortiguador). El tejido se homogenizó y la extracción se realizó durante 1 hora a 4 °C con agitación constante. Posteriormente se centrifugó el tejido lisado 15 minutos a 8000 rpm a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, luego se volvió a centrifugar 15 minutos a 12 000 rpm a 4°C, es en el sobrenadante donde se encuentran las proteínas.

6.8.2. Cuantificación de proteína

La concentración de proteínas celulares contenidas en los homogenizados se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Esta técnica se fundamenta en la fijación del colorante Azul de *Coomasie* a las proteínas, dando lugar a un cambio en el color que es medido espectrofotométricamente.

Se preparó una curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA) por duplicado a concentraciones: 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL como se muestra en el Cuadro 7 y se realizó la curva de calibración, graficando absorbancia a 595 nm vs concentración de proteína.

Cuadro 7. Preparación de curva de calibración

Celda	Conc. BSA (µg)	H ₂ O (µL)	Sol. Stock BSA (µL)	Reactivo de Bradford (µL)
Blanco	0	800	0	200
2	2.5	775	25	200
3	5	750	50	200
4	10	700	100	200
5	15	650	150	200
6	20	600	200	200

Para realizar la cuantificación de proteínas, se tomaron 2 µL de muestra, se diluyó a 800 µL con H₂O destilada, se le agregan 200 µL de azul de *Coomasie* a cada una de las muestras. Se prepararon muestras por duplicado, se incubaron durante 5

min y se leyeron a una absorbancia de 595 nm, para luego determinar la concentración en las muestras, al interpolar los datos. El rango lineal del ensayo para BSA es de 1.2 a 10 µg/mL.

6.8.3. Electroforesis SDS-PAGE

Se realizaron cálculos para cargar 20 µg de proteína en cada pocillo y se adicionó el amortiguador de carga en relación 1:1, se adecuó a un volumen de carga de 45 µL; las muestras se llevaron a 99°C durante 5 min con agitación a 550 rpm.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 7.5%, se cargaron las muestras (150 µg) y los marcadores de peso molecular. Se corrió la electroforesis durante 15 minutos a 100 V y 60 min a 150 V hasta que el azul de bromofenol llegara al final del gel.

6.8.4. *Western Blot*

Al concluir la separación de las proteínas en función de su peso molecular, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Biosciences). Mediante la aplicación de un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana, donde quedan fuertemente adheridas. Se llevó a cabo la humidificación de los materiales en el amortiguador de transferencia en el siguiente orden: Cassette (cátodo, lado claro), esponja, papel *Whatman*, membrana, gel, papel *Whatman*, esponja, cassette (ánodo, lado oscuro). Se colocó en el aparato de transferencia con el lado oscuro hacia el cátodo, debido a la carga negativa de las proteínas a causa del SDS, éstas migrarán hacia el cátodo y se transferirá 1 hora a 120 mA.

Luego de transferir se lavó la membrana durante 10 minutos en PBS 1X para eliminar restos de poliacrilamida. Se bloqueó con leche al 3% durante 3 horas; esto se realizó para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos utilizados para la detección de la proteína de interés a la superficie la membrana. Pasado el tiempo de bloqueo, la membrana se lavó tres veces en PBS 1X; estos lavados son

necesarios para eliminar los excesos de reactivos no unidos y para reducir el ruido de fondo.

Se incubó toda la noche a temperatura ambiente y con agitación con los anticuerpos primarios diluidos en solución bloqueadora al 1%. Se utilizaron los anticuerpos adecuados a una concentración de 1:300, diluidos en PBS 1X y leche a 0.5%. Una vez concluida la incubación, se lavó la membrana en PBS 1X y se incubó con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP), anti-conejo o anti-cabra según fuera el caso, a una concentración de 1:1000 en PBS 1X; se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación y luego se lavó la membrana tres veces en PBS 1X.

6.8.5. Detección y revelado

La detección se realizó por medio del ensayo de quimioluminiscencia potenciada. La membrana se sumergió el tiempo optimizado en los experimentos preliminares en el reactivo de detección. Esto provocó una oxidación catalizada por peroxidasa de rábano, que produce quimioluminiscencia del luminol, donde se une la proteína HRP marcada para el antígeno a detectar en la membrana. La luz resultante se detectó en la película de autoradiografía.

El proceso de revelado debe llevarse a cabo en un cuarto oscuro. Se tomó la película de autoradiografía (Amersham Biosciences) y se presionó contra la membrana de PVDF en el HYPERCASSETTE durante 2 minutos. Pasado el tiempo, se tomó la placa y se sumergió en el revelador, se enjuagó con agua, se sumergió en el fijador y por último se volvió a enjuagar con agua, sumergiéndose la película 1 minuto en cada solución.

Terminado el revelado, en la película se observaron señales que indican la presencia de la proteína deseada. Dichas señales se compararon guiadas por el marcador de peso molecular y mediante estudio densitométrico se evaluó la diferencia de expresión entre cada tratamiento.

6.9. Cuantificación de los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α en el encéfalo mediante ELISA

La homogeneización de tejido de rata se hizo de acuerdo al método de Bradford y el procedimiento de la técnica de ELISA se basó en los insertos de cada uno de los kits de ELISA para IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α de Peprotech®.

6.10. Docking molecular

Los estudios de docking molecular fueron llevados a cabo usando el software Schrödinger para analizar los detalles de unión de teobromina con los receptores de adenosina A_{2A}R. Las estructuras 2D y 3D de la teobromina fueron dibujadas usando el software Maestro 10.5. La estructura cristalográfica del receptor A_{2A} fue descargada de PDB (3QAK) para ser usada como archivo de entrada de la proteína. Las moléculas de agua y los ligandos en la estructura cristalográfica fueron removidos y los hidrógenos fueron adicionados a la proteína. Las estructuras dimensionales se prepararon obteniendo un estado de protonación preciso (pH=8) y las geometrías moleculares a pH fisiológico con el software MarvinSketch versión 18.10.

6.11. Análisis estadístico

Las diferencias en el contenido de proteína, así como los resultados de las pruebas conductuales fueron determinados por ANOVA de dos vías seguido de una prueba *posthoc* de Bonferroni. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Todos los datos numéricos son expresados como media \pm SEM.

7. RESULTADOS

7.1. Validación del modelo animal con dieta alta en grasas

La Enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo progresivo e irreversible caracterizado por la acumulación de placas amiloideas y de marañas neurofibrilares. Dicha acumulación lleva a las características clínicas de la enfermedad, como lo son el deterioro cognitivo y de memoria. La EA puede ser clasificada en dos tipos de acuerdo a la etiología y la aparición: la EA esporádica o de aparición tardía (EAs) y la EA familiar o de aparición temprana (EAf). La EAs abarca un porcentaje altamente significativo de la población con EA (95%), y es debida a factores como lo son la edad, carga del alelo e4 de APOE, obesidad en edad temprana, diabetes mellitus, entre otros. Es por ello, que en este trabajo se enfocó en el desarrollo de un modelo animal a partir de una dieta enriquecida en grasas a largo plazo (6 meses) y al mismo tiempo, uno de los grupos fue tratado con teobromina a 30 mg/L para evaluar el efecto sobre marcadores patológicos de la EA.

Los animales que fueron alimentados con dieta alta en grasas (DEG y DEG+30) mostraron incremento significativo constante del peso absoluto a partir del tercer mes de tratamiento comparado con el grupo CTRL (Figura 16A); además, como puede observarse en la Figura 16B, los grupos de animales alimentados con dietas altas en grasas (DEG y DEG+30) mostraron un incremento del triple del peso comparado a el grupo CTRL, grupo que en promedio incrementó en promedio 100 g al final del tratamiento, mientras que entre los dos grupos alimentados con manteca de cerdo (DEG y DEG+30) no hubo diferencia significativa en la ganancia de peso al final del tratamiento.

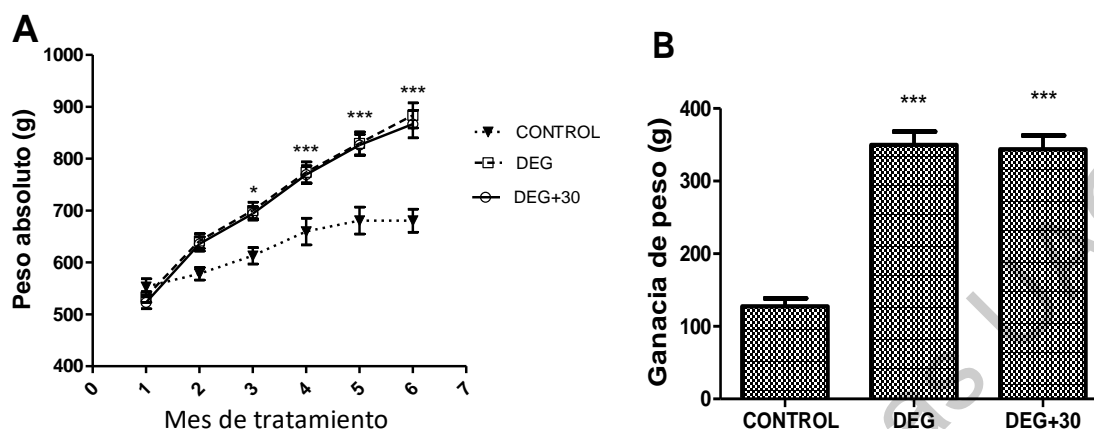


Figura 16. (A) Variación del peso a través del tiempo de tratamiento (6 meses) requerido para la generación del modelo animal de EAs, y (B) ganancia de peso en g de los animales al final del tratamiento. Los animales alimentados con manteca de cerdo incrementaron significativamente en peso corporal comparados con el grupo control. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Por otro lado, los niveles de colesterol y triglicéridos fueron medidos en sangre al inicio y al final del tratamiento mediante los *kits Accutred cholesterol* y *Accutrend triglycerides*. En primer lugar, los niveles de colesterol no se vieron afectados en el modelo animal (Figura 17A); mientras que, los niveles plasmáticos de triglicéridos se vieron alterados significativamente en los grupos que tuvieron dieta alta en grasas (DEG y DEG+30) mostrando un incremento comparado con los animales CTRL (Figura 17B).

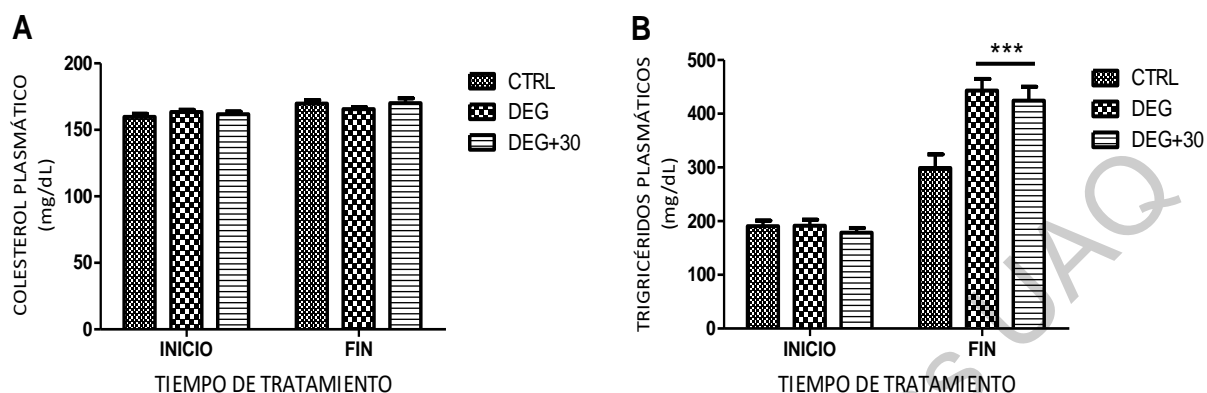


Figura 17. Evaluación de los niveles plasmáticos de (A) colesterol y (B) triglicéridos al inicio y fin del tratamiento. Los animales de los grupos alimentados con manteca de cerdo (DEG y DEG+30) mostraron un incremento significativo en los niveles plasmáticos de triglicéridos pero no de colesterol. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. *** $p < 0.001$.

7.2. Pruebas cognitivas y de memoria

7.2.1. Laberinto radial de 8 brazos

Con la finalidad de evaluar la memoria a largo plazo y algunos otros parámetros cognitivos, se llevó a cabo la prueba de laberinto elevado de 8 brazos a lo largo del tratamiento. Los parámetros a evaluar en dicha técnica fueron los siguientes: tiempo que tardaban los animales en encontrar la recompensa (que en este caso eran dos bebederos con agua) guiados por objetos clave en cada entrada de los brazos del laberinto (objetos de diferente color y tamaño), entradas totales a los brazos del laberinto, entradas a brazos correctos e incorrectos, así como la toma de recompensa de los brazos que la contenían. Dicha técnica se realizó en tres fases de acuerdo al tiempo de tratamiento: Habitación (1er mes), entrenamiento (3er mes) y prueba (5º mes). Cada experimento fue realizado por duplicado en 3 días diferentes. Los resultados de la latencia (tiempo que tardaban los animales en encontrar la recompensa) durante las tres fases evaluadas se muestran en la Figura 18.

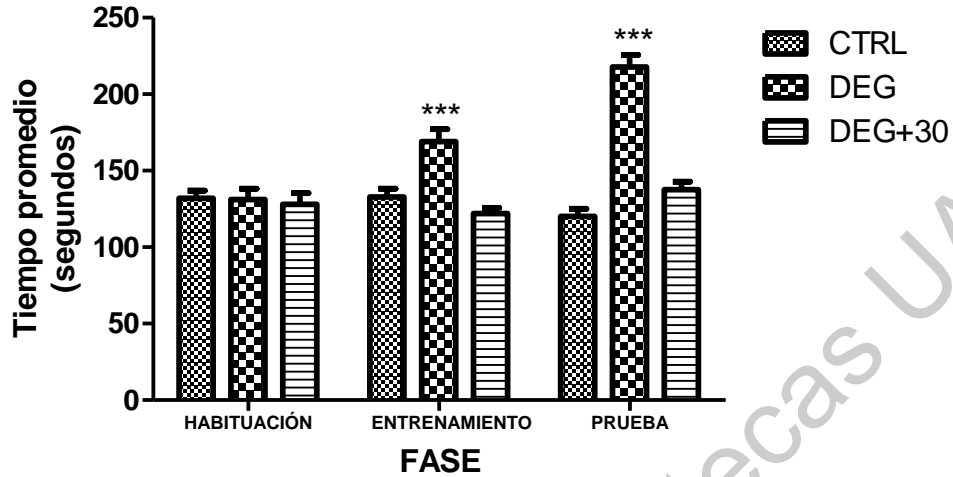


Figura 18. Tiempo promedio requerido de los animales de los diferentes grupos para encontrar la recompensa en el laberinto elevado de 8 brazos. Los animales alimentados con dieta alta en grasas mostraron un incremento significativo en el tiempo que requerían para encontrar la recompensa en las fases de entrenamiento y de prueba del laberinto, mientras que los animales que fueron tratados con teobromina no tuvieron diferencia significativa con respecto al control. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. *** $p < 0.001$.

Durante la fase de habituación, puede observarse en la gráfica, no hubo diferencias significativas entre grupos en el tiempo que tardaban en encontrar la recompensa dentro del laberinto, además de que en promedio tardaron en promedio 120 segundos por grupo. Por otro lado, durante la fase de entrenamiento llevada a cabo al tercer mes de tratamiento, puede observarse que el grupo que fue alimentado con dieta enriquecida en manteca de cerdo (DEG) incrementó significativamente ($p < 0.001$) en el tiempo requerido para encontrar la recompensa (30 segundos más en promedio) comparado con el grupo CTRL, por lo que se puede inferir que la manteca tiene efecto negativo sobre procesos de memoria. Asimismo, el tiempo se siguió incrementando significativamente en este grupo (DEG) con respecto a los animales control (alrededor de 100 segundos en promedio) durante el quinto mes

de tratamiento que fue cuando se evaluó la fase de prueba del laberinto. Cabe resaltar que tanto en la fase de entrenamiento como en la fase de prueba, los animales que a pesar de que fueron alimentados con la misma dieta pero tratados con teobromina a 30 mg/L (DEG+30), no mostraron diferencia significativa en ambas fases comparados con los animales control.

Simultáneamente, se estuvieron evaluando diversos parámetros para complementar las pruebas de memoria a largo plazo. En la Figura 19 pueden mostrarse los resultados de dichos factores. Durante el tiempo que pasaban los animales dentro el laberinto (5 minutos) se estuvo monitoreando la cantidad de veces que entraban indistintamente los animales a los brazos del laberinto a lo largo de las tres fases evaluadas (Figura 19A). En esta gráfica puede observarse que durante las fases de entrenamiento y prueba no hubo diferencia significativa entre grupos en la cantidad de entradas a los brazos del laberinto, sin embargo, durante la fase de prueba puede observarse que el grupo alimentado con manteca de cerdo (DEG) mostró un incremento significativo en las entradas totales a los brazos del laberinto comparado con los grupos CTRL y DEG+30.

Adicionalmente, de las entradas totales a los brazos del laberinto se contabilizó el número de entradas a brazos correctos (Figura 19B) y a brazos incorrectos (Figura 19C) del laberinto, donde un brazo correcto era el que contenía la recompensa y un brazo incorrecto el que no la contenía. En cuanto a estos dos resultados, puede observarse que durante la fase de habituación no hubo diferencia significativa entre grupos en ambos parámetros, mientras que tanto en la fase de entrenamiento como en la fase de prueba hubo un decremento y un incremento estadísticamente significativos en el número de entradas a brazos correctos e incorrectos, respectivamente. Por último, se evaluó la cantidad de veces que el animal tomó la recompensa cada que el animal entraba a un brazo correcto (Figura 19D).

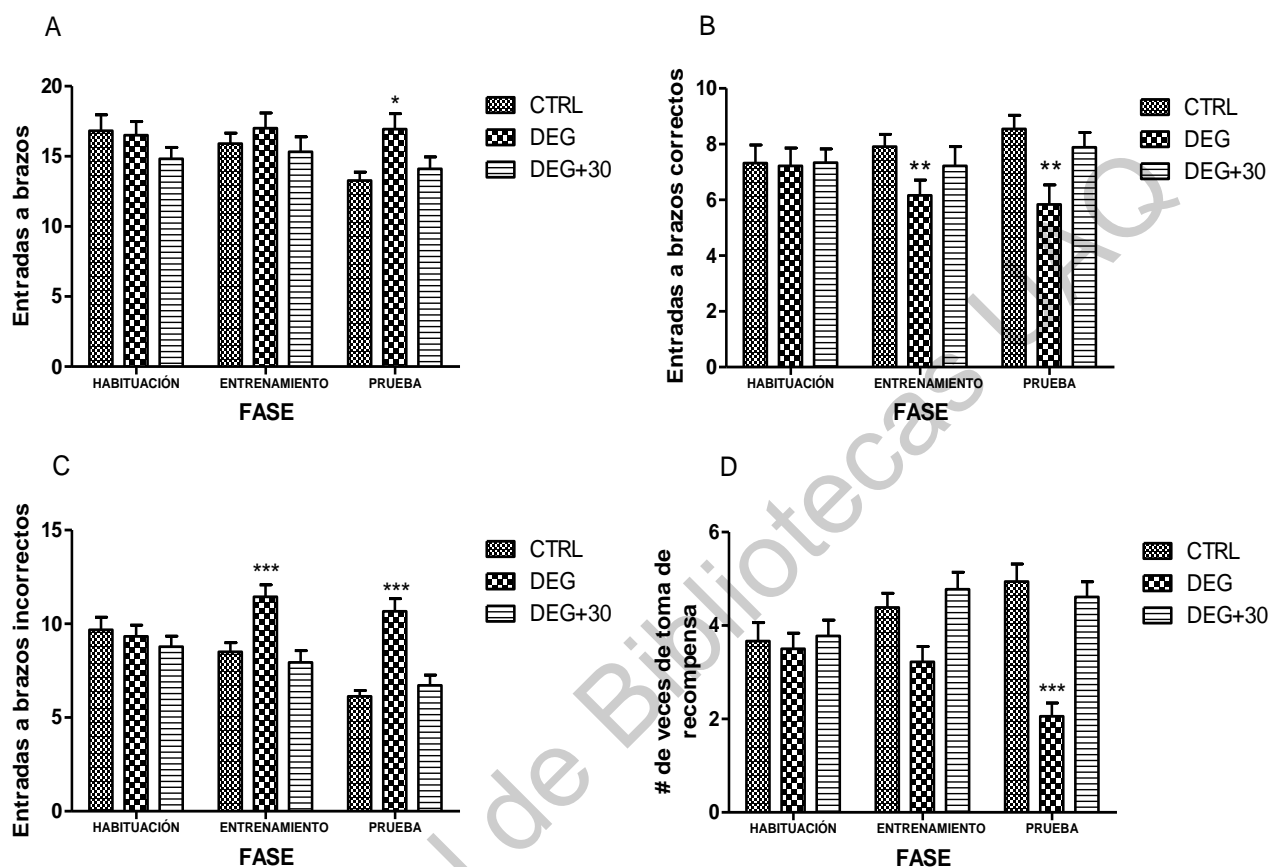


Figura 19. Distintos parámetros evaluados en el laberinto elevado de 8 brazos al tiempo que tardaban los animales en encontrar la recompensa: (A) Entradas totales a los brazos del laberinto, (B) Entradas a brazos correctos, (C) Entradas a brazos incorrectos y (D) Número de veces de toma de recompensa. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.2.2. Índice de reconocimiento de objeto nuevo (IRON)

La prueba de reconocimiento de objeto nuevo (RON) es una técnica que sirve para evaluar el estatus cognitivo de roedores y se basa en el comportamiento espontáneo de los animales, con la grana ventaja de que no requiere recompensa o castigo como es el caso del laberinto elevado de 8 brazos. Además de que esta técnica evalúa procesos de memoria a corto plazo, ya que se realiza rápidamente con una

simple fase de entrenamiento. Como se mencionó anteriormente en metodología, ésta técnica consta de dos fases, la primera (fase de entrenamiento), consta de un campo abierto en el que son colocados dos objetos idénticos (objetos familiarizados) en dos esquinas del campo; y la segunda fase o fase de prueba, en la que se cambia un objeto familiar por un objeto nuevo (objeto diferente a los familiarizados). En ambas fases se pusieron individualmente los animales a que interactuaran con los objetos por 5 minutos. Con respecto a estos resultados, puede observarse en la Figura 20 que durante la fase de entrenamiento no hubo diferencia significativa entre grupos, sin embargo, durante la fase de prueba puede mostrarse en la gráfica que hubo una reducción significativa en el IRON del grupo alimentado con grasas sin tratamiento (DEG), mientras que con tratamiento (DEG+30) no hubo diferencia significativa; ambos grupos comparados con el grupo CTRL.

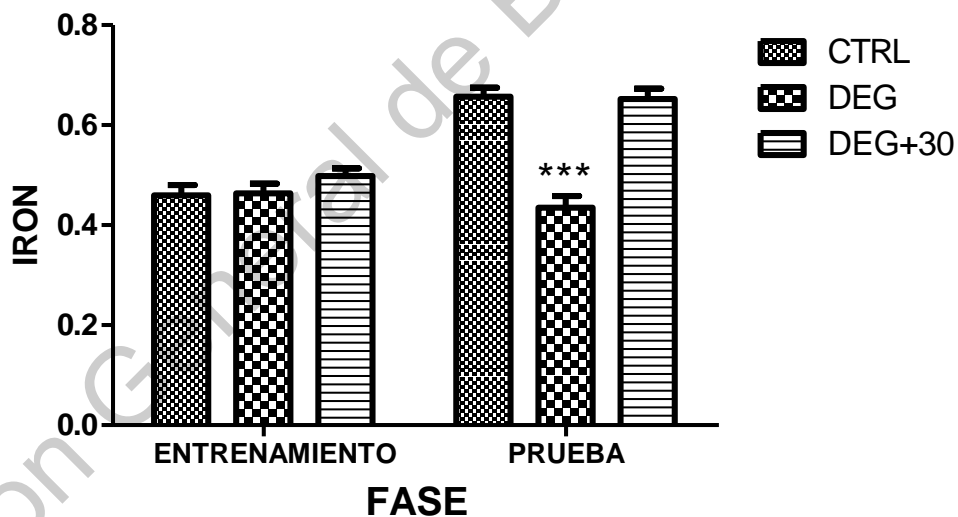


Figura 20. Evaluación del índice de reconocimiento de objeto nuevo (IRON). Se puede mostrar que no hubo diferencia significativa entre grupos en la fase de entrenamiento, mientras que en la fase de prueba hubo una reducción significativa del IRON en el grupo DEG comparado con los grupos CTRL y DEG+30. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. *** $p < 0.001$.

7.3. Distribución y expresión del péptido y placas β -amiloide

Para evaluar la distribución del péptido β -amiloide en la corteza frontal, se hizo un análisis por inmunofluorescencia en cortes coronales del tejido. Para determinar si el tejido era autofluorescente se realizaron inmunohistoquímicas de cortes utilizados como blancos, con el objetivo de determinar que la marca que se observaba de la inmunohistoquímica indirecta era específica (Figura 21).

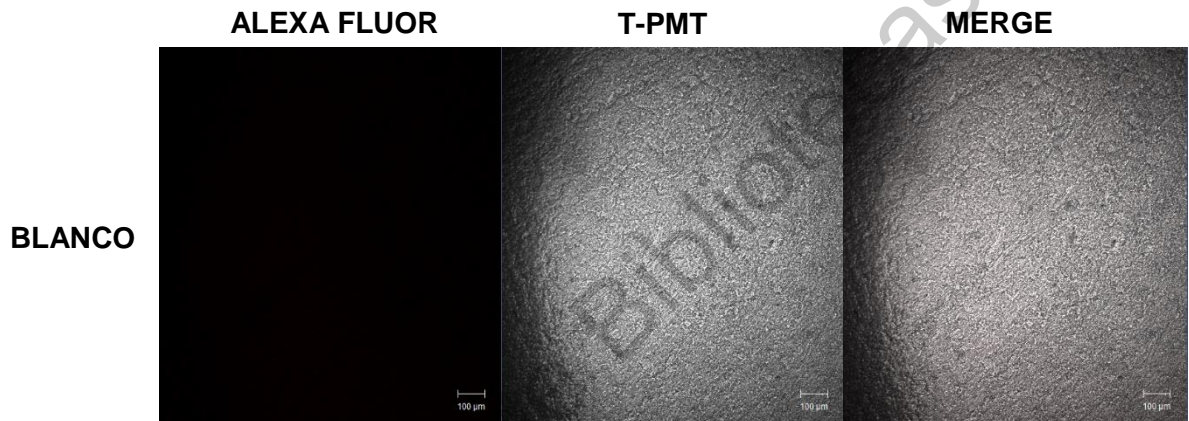


Figura 21. Blanco de la técnica con anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 de corteza frontal. Fotografías tomadas con aumento de 20X. Abreviaturas: T-PMT, tubo fotomultiplicador.

Las imágenes obtenidas de la expresión del péptido $A\beta$ en corteza frontal se encuentran en la Figura 22. Como se muestra en las imágenes de la Figura 22, a simple vista puede observarse que hay un incremento en la expresión del péptido $A\beta$ en el grupo alimentado con dieta alta en grasas (DEG). Por otro lado, puede mostrarse que cuando se combinó la dieta alta en grasas y tratamiento con teobromina (DEG+30) hay sólo un ligero incremento de la expresión de este péptido, sin embargo se encuentra en menor concentración que en el grupo que solamente fue alimentado con dieta alta en grasas (DEG).

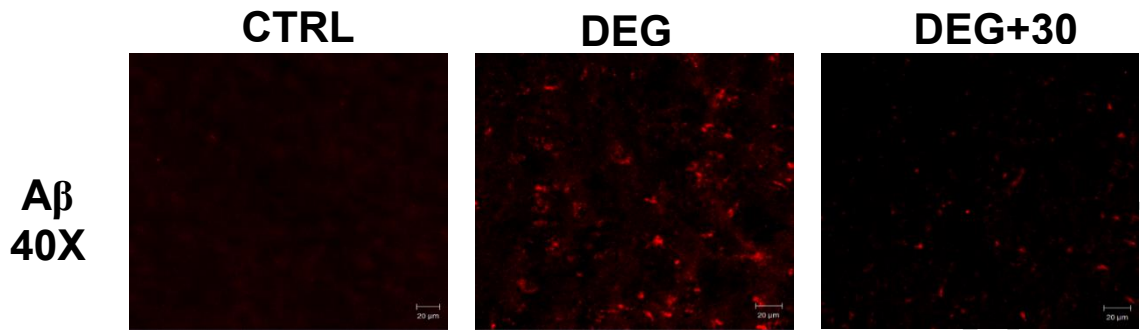


Figura 22. Expresión del péptido A β en corteza frontal de los diferentes grupos evaluados. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L.

Para semicuantificar los niveles del péptido y placas A β se realizó la técnica de *Western Blot* de corteza frontal de los diferentes grupos evaluados. La Figura 23 muestra los resultados obtenidos de la expresión de péptidos y placas A β . Como puede mostrarse en la imagen, el péptido de 42 aminoácidos correspondiente a las bandas encerradas en el recuadro verde, así como las placas A β (recuadro rojo) de ~132 KDa se expresaron mayoritariamente en el modelo animal generado por dieta alta en grasas (DEG), mientras que en el grupo DEG+30 se redujo la expresión de ambos. Además, puede observarse en la figura que tanto en la proteína precursora de amiloide (APP o A4 amiloide) encerrado en recuadro azul como en los oligómeros de A β encerrados en recuadro amarillo, no se observa diferencia en la expresión de dicha proteína y agregados amiloideos entre grupos.

Además se llevó a cabo la semicuantificación de las bandas obtenidas en el *Western Blot*. Para ello, con el fotodocumentador se tomaron las respectivas figuras de las placas reveladas, y mediante el software Image Lab 6.0.1 se realizó la respectiva semicuantificación de las bandas obtenidas. Los datos obtenidos (en unidades arbitrarias) se llevaron a análisis estadístico, donde se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 24. Como puede mostrarse en la figura, se encontró un incremento significativo en la expresión tanto del péptido A β_{42} como de las placas formadas por este péptido en el grupo DEG con respecto al grupo CTRL; mientras que entre los grupos CTRL y DEG+30 no hubo diferencia significativa.

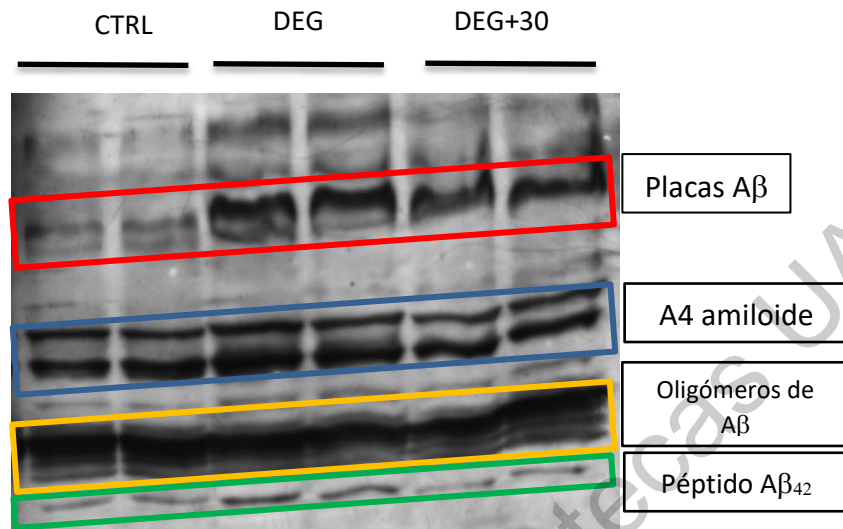


Figura 23. Expresión del péptido y placas A β en corteza frontal de los diferentes grupos evaluados. Como puede observarse en la figura, existe un incremento en la expresión del péptido A β en su forma oligomérica y de placas en el grupo DEG, mientras que en el grupo DEG+30 se observan niveles parecidos a los del grupo CTRL. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L.

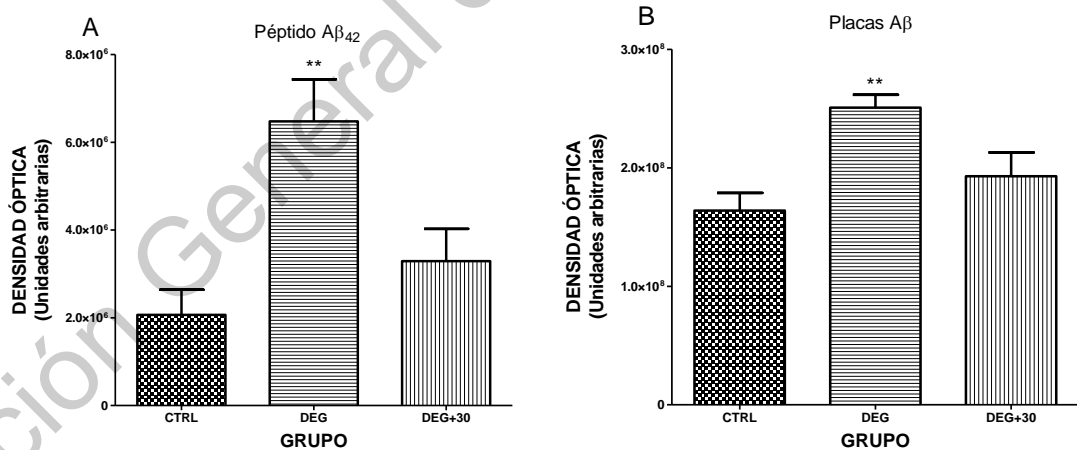


Figura 24. Análisis densitométrico de la expresión del péptido A β_{42} (A) y de las placas amiloides (B) en corteza frontal de los diferentes grupos evaluados. Se puede observar en la imagen que existe un incremento significativo en la expresión de la forma monomérica y de placa del péptido A β_{42} en el grupo DEG comparado al CTRL, mientras que no existe cambio significativo entre los grupos CTRL y DEG+30. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. ** $p < 0.01$.

7.4. Expresión de los marcadores patológicos de la EA

Para evaluar el incremento del péptido $A\beta_{42}$ en corteza frontal de los animales que tuvieron dieta alta en grasas se determinó la expresión de las secretasas involucradas en la vía amiloidogénica (BACE1 y PSEN1) y en la no amiloidogénica (ADAM10); así como el segundo marcador patológico de la EA, la proteína tau total y la proteína tau fosforilada. Los resultados obtenidos en este punto se muestran en la Figura 25. Con respecto a la expresión de α -secretasa (ADAM10) no se encontró diferencia entre los grupos evaluados. Por otro lado, cuando se realizó la semicuantificación de las secretasas involucradas en la vía amiloidogénica (BACE1 y PSEN1, correspondientes a β -secretasa y γ -secretasa, respectivamente) se encontró en el análisis densitométrico que ambas secretasas se incrementaron significativamente en el grupo DEG comparadas con el grupo CTRL; cabe resaltar que estas enzimas no cambiaron significativamente en el grupo DEG+30 respecto al grupo CTRL.

Adicionalmente, mediante la misma técnica se evaluó la expresión de tau y tau fosforilada (p-tau Ser-262) en corteza frontal (Figura 25). Como puede observarse en la misma figura no hubo diferencia significativa entre grupos en la expresión de ambas proteínas. Sin embargo, al calcular el intervalo tau total / p-tau (Ser-262), este rango se vio alterado entre grupos. En la gráfica puede verse que dicho parámetro se incrementó de manera significativa en el grupo DEG comparado con el grupo CTRL, mientras que el grupo DEG+30 no mostró diferencia. Sin embargo, cuando comparamos el grupo DEG vs DEG+30, puede observarse en la gráfica que hay una reducción significativa ($p < 0.01$) de este intervalo en el grupo DEG+30.

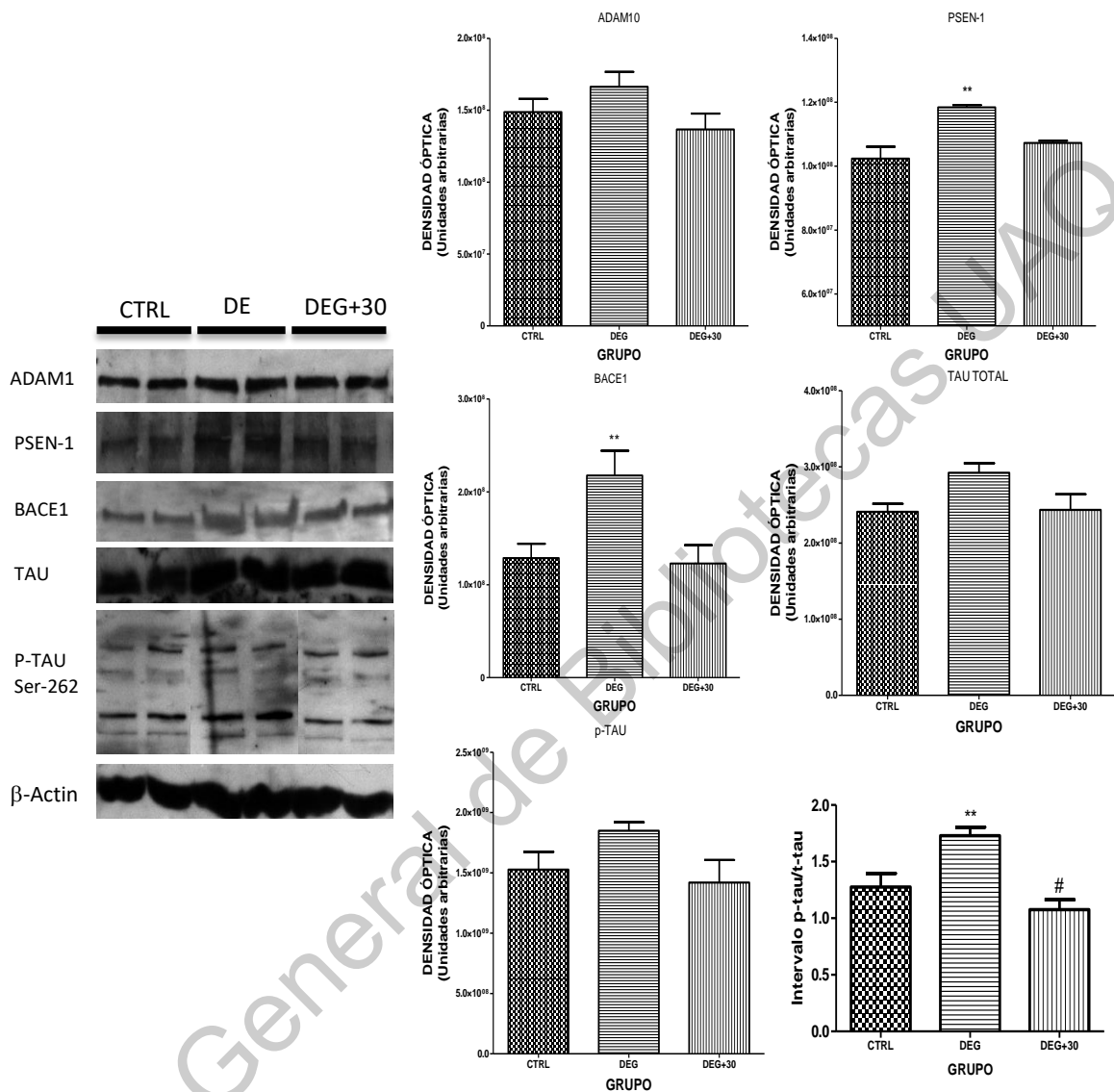


Figura 25. Expresión de marcadores patológicos de la EA. En la imagen se muestran la expresión en corteza frontal de distintas secretasas involucradas en la escisión de la proteína precursora amiloide de los distintos grupos evaluados, así como la expresión y el intervalo de tau y p-tau (Ser-262). Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. ** $p < 0.01$, diferencia con respecto al CTRL; # $p < 0.05$, diferencia con respecto al grupo DEG.

7.5. Expresión de citocinas mediante ELISA

Con el objetivo de buscar mecanismos secundarios de la EA, se cuantificaron citocinas en corteza frontal de los animales mediante la técnica de ELISA. La Figura 26 muestra los resultados correspondientes a las interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α (Figura 26A, 26B, 26C y 26D, respectivamente). Como se observa en la figura, las interleucinas medidas en corteza frontal de los animales que tuvieron dieta alta en grasas (DEG) se incrementaron significativamente comparados con el grupo CTRL. Por otro lado, los resultados correspondientes a las interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 de los animales tratados con teobromina (DEG+30) no mostraron diferencia con respecto a los animales del grupo CTRL, sin embargo cuando comparamos contra el grupo DEG, podemos observar que existe una reducción significativa de la expresión de estas interleucinas. Cabe destacar que en cuanto a la expresión de TNF- α (Figura 26D) de este grupo, se muestra que disminuye significativamente la expresión, sin embargo, no al mismo nivel que el grupo CTRL.

7.6. Docking molecular de teobromina con el receptor A_{2A}

Las herramientas computacionales han sido esenciales para entender la interacción ligando-receptor. Por ello, las interacciones y los centros de unión de la teobromina con el receptor de adenosina A_{2A}R, un receptor ampliamente relacionado a la EA, fue evaluado mediante métodos computacionales. La Figura 27 muestra las interacciones en una estructura 2D, mientras que la Figura 28 las muestra en 3D. En la estructura bidimensional se encontró que la teobromina presenta dos interacciones importantes: una interacción de puente de Hidrógeno con el aminoácido asparagina 253 (ASN253) entre el grupo amino y el oxígeno perteneciente al carbono 2 de la teobromina; y una interacción de tipo π - π entre el anillo aromático de la fenilalanina 268 (PHE268) y el heterociclo de purina de la teobromina (o 3,7-dimetilxantina). En la Figura 28 se muestran las mismas interacciones en una estructura tridimensional.

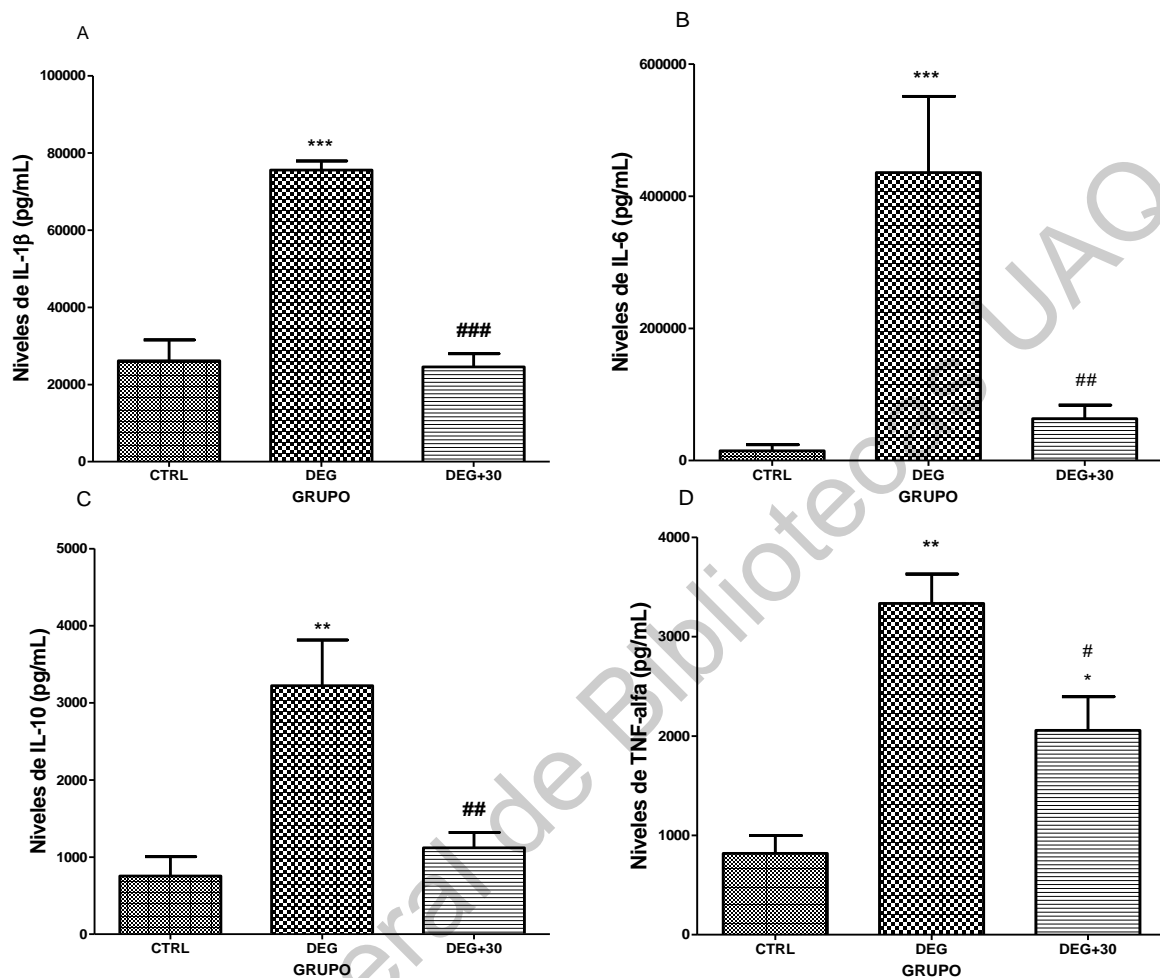


Figura 26. Expresión de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α en corteza frontal de los diferentes grupos evaluados. Se puede observar que el grupo alimentado con dieta enriquecida en grasas mostró un incremento significativo de la expresión de las citoquinas analizadas; además de que el grupo DEG+30 redujo dichas citoquinas. Abreviaturas: CTRL, control; DEG, dieta enriquecida en grasas; DEG+30, dieta enriquecida en grasas y tratamiento con teobromina a 30 mg/L. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías con prueba *posthoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, donde * es diferencia con respecto al CTRL; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, donde # es diferencia con respecto al grupo DEG.

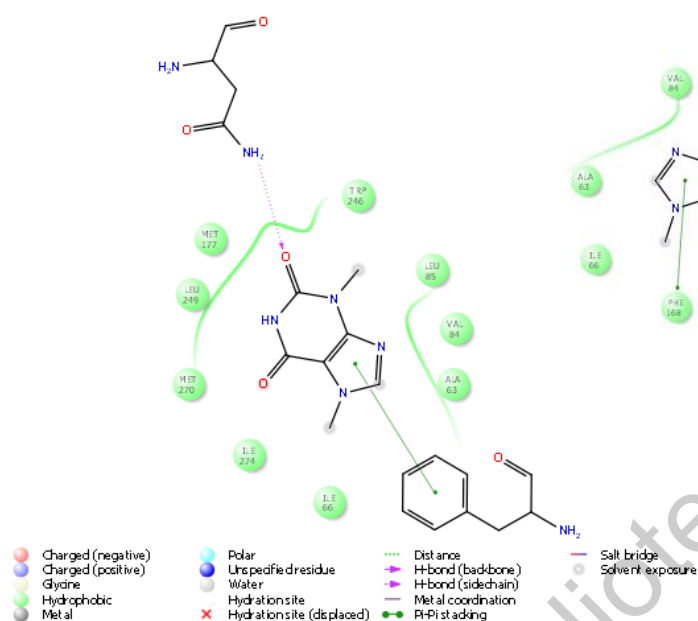


Figura 27. Interacciones entre la teobromina y los residuos del sitio de unión del receptor A_{2A}R representados en imagen 2D.

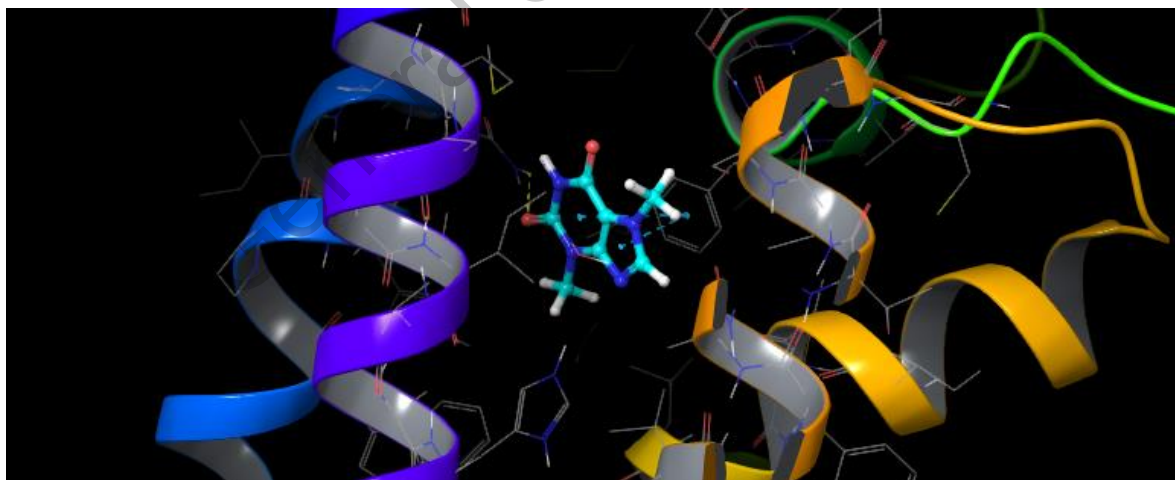


Figura 28. Interacciones entre la teobromina y los residuos del sitio de unión del receptor A_{2A}R representados en imagen 3D.

8. DISCUSIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son generalmente esporádicas y usualmente influenciadas por diferentes genes, el estilo de vida de la persona y ciertos factores ambientales. La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible que involucra el deterioro cognitivo y de memoria, desorientación en espacio y tiempo, pérdida del juicio, entre otras. De acuerdo a la Asociación Internacional de Alzheimer, existen más de 100 formas diferentes de demencia, de las cuales entre el 50 y 60 % corresponde a EA (ADI, 2018). Actualmente, se ha relacionado a la incidencia de EA con los desórdenes metabólicos como la obesidad.

Estudios recientes han demostrado que la obesidad, las dislipidemias y la diabetes tipo 2, son factores de riesgo de la EA (Hascup *et al.*, 2019; Nakandakari *et al.*, 2019; Samadi *et al.*, 2019; Kothari *et al.*, 2017; Maesako *et al.*, 2015). Anteriormente, demostramos que una dieta alta en grasas administrada por un largo periodo inducía las características de la obesidad (Mendiola-Precoma *et al.*, 2017). En este trabajo se evaluó el efecto de la dieta enriquecida en grasas a base de manteca de cerdo administrada a largo plazo (6 meses) sobre los marcadores patológicos de la EA; simultáneamente, evaluamos los posibles mecanismos de la teobromina sobre dichos marcadores.

La prevalencia global del síndrome metabólico, que puede ser ocasionado por desórdenes fisiológicos como la obesidad, es alta e incrementa progresivamente, además de que actualmente representa un problema de salud pública (Treviño *et al.*, 2015). La obesidad es trastorno fisiológico ocasionado por la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, que se genera principalmente por dietas hipercalóricas y por inactividad física. Las dietas ricas en carbohidratos o grasas son consideradas como dietas hipercalóricas (OMS, 2019). Los lípidos, los cuales incluyen ácidos grasos, grasas neutras, ceras y esteroides, son los mayores constituyentes de las membranas celulares y también sirven como moléculas

señaladoras a nivel intra- y extracelular. Pueden ser clasificados en ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esteroides, esfingolípidos y lípidos prenóles (Lim *et al.*, 2014). En esta investigación se desarrolló el modelo de la EA de tipo esporádico inducido por obesidad a través de una dieta enriquecida en manteca de cerdo al 33% (1:2). Marcadores de obesidad como el peso de los animales y los niveles de colesterol y triglicéridos fueron monitoreados a lo largo de la dieta. Los resultados obtenidos demostraron que en el modelo generado el peso y los niveles de triglicéridos se vieron incrementados respecto al grupo CTRL, mientras que los niveles de colesterol no se vieron alterados en ningún grupo de animales. La manteca de cerdo al ser una mezcla de grasas, principalmente de grasas saturadas, ocasiona que a largo plazo haya una desregulación de lípidos como lo son los triglicéridos, y por consecuencia un incremento anormal del peso absoluto de los animales. Asimismo, pudimos observar que la teobromina no alteró estos parámetros, por lo que podemos decir que esta xantina no está relacionada al metabolismo de lípidos.

Las pruebas conductuales son esenciales para comprobar el modelo de la EA, debido a que la cognición y la memoria son características alteradas en los pacientes con la EA. La prueba de laberinto elevado de 8 brazos se utilizó para evaluar distintos tipos de memoria, primordialmente relacionados a la memoria de largo plazo. El principal resultado obtenido de esta prueba fue que en el modelo alimentado con dieta alta en grasas se observó que durante las fases de entrenamiento y prueba hubo un incremento significativo (casi del doble) en el tiempo que requerían los animales para encontrar la recompensa dentro del laberinto, por lo que se puede decir que esta dieta ocasiona un severo déficit de aprendizaje y memoria. Simultáneamente se estuvieron monitoreando diversos parámetros durante todo el proceso de esta técnica, por lo que al verse alterados la entrada a brazos correctos, como incorrectos, así como la toma de recompensa se puede discutir que la dieta alta en grasas ocasiona deterioro en las memorias de referencia, espacial y procedimental, que se encuentran catalogadas

dentro de la memoria a largo plazo. Dicho fenómeno observado en los animales es consistente con los observados en pacientes con EA. Del mismo modo, Valladolid-Acebes *et al.*, (2011) encontraron resultados similares al observar que la dieta alta en grasas administrada durante 2 meses ocasionaba un incremento del peso y del deterioro cognitivo de ratones.

Además, mediante la técnica de reconocimiento de objeto nuevo (RON), se procedió a corroborar el deterioro cognitivo (memoria a corto plazo) de los animales. Al analizar los resultados obtenidos de esta técnica (IRON) podemos interpretar que la obesidad generada en los animales alimentados con DEG ocasiona un deterioro también de la memoria a corto plazo, ya que el índice fue significativamente menor que el grupo control; mientras que el tratamiento con teobromina protegió de daños cognitivos evaluados en esta prueba y en el laberinto radial. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Jeong *et al.*, (2019), quienes demostraron que la dieta alta en grasas en ratones por 9 semanas ocasionó una disminución del IRON. La prueba de RON está basada en el comportamiento espontáneo de los animales; por lo que, la principal ventaja de esta prueba es el hecho de que no requiere recompensa ni castigo, así como que requiere únicamente una fase de entrenamiento (Bengoetxea *et al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado una asociación entre la dieta alta en grasas y la carga proteica de A β ocasionada por mutaciones en APP y PSEN1, ya que se reportó un decremento del IRON relacionado a un aumento de triglicéridos plasmáticos pero no de colesterol (Petrov *et al.*, 2015). Por otro lado, la teobromina al tener efectos positivos sobre la cognición y la memoria, pudiera deberse a la modulación de los sistemas catecolaminérgico y colinérgico (Cova *et al.*, 2019) o a través de los receptores de adenosina (Mendiola-Precoma *et al.*, 2017).

En contraste, en trabajos previos donde evaluamos la misma dieta, pero en diferente cepa de rata (Sprague-Dawley), se observaron los mismos efectos cognitivos y de memoria, sin embargo, los niveles de colesterol se incrementaron significativamente comparados al grupo CTRL, factor que no fue alterado en este trabajo, por lo que el

efecto puede ser atribuido al incremento de los niveles de triglicéridos observado también en ratones alimentados por 9 semanas con dieta alta en grasas (Jeong *et al.*, 2019). Adicionalmente, la manteca de cerdo al estar constituida principalmente por ácidos grasos como ácido oleico, ácido esteárico y ácido palmítico (Belitz *et al.*, 2009), ocasiona dislipidemias, obesidad y resistencia a la insulina (Lim *et al.*, 2014). Recientemente, un estudio de cohorte en pacientes con EA fue llevado a cabo para evaluar la relación EA-metabolismo de lípidos, donde se concluyó que un set de lípidos séricos co-regulados fueron asociados con la fisiopatología de la EA (Barupal *et al.*, 2019). De acuerdo a Hane *et al.*, (2011), las dietas altas en ácido palmítico, como lo es la manteca de cerdo, conllevan a un aumento en el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), lo cual acelera la formación y agregación del péptido amiloide, que descontrola la fluidez de la membrana y eventualmente lleva a la apoptosis celular.

Por otro lado, se evaluó la expresión del péptido A β y de placas amiloideas (marcadores patológicos de la EA) mediante inmunofluorescencia y *Western Blot*. En ambos resultados se demostró que había un incremento en la expresión de este péptido, en su forma monomérica como polimérica, en la corteza frontal de los animales que tuvieron dieta enriquecida en grasas (DEG). Mediante el *immunoblot* se pudieron analizar los diferentes los diferentes conglomerados del péptido, en donde encontramos únicamente un incremento significativo de la expresión monomérica, así como en forma de placa, del péptido A β ₄₂ en los animales con DEG; mientras que con respecto a la expresión de la proteína precursora de amiloide (A4 o APP) o en la forma oligomérica no hubo diferencia entre grupos. Considerablemente, en un estudio longitudinal se encontró que el índice de masa corporal está relativamente poco relacionado a la carga cortical de A β y el daño cognitivo en adultos mayores; sin embargo, como se menciona en este trabajo, el índice de masa corporal es una medida no específica de la composición corporal y puede no reflejar la cantidad y distribución de la grasa en el cuerpo (Thirunavu *et al.*, 2019).

Debido a que la localización del tejido adiposo ha demostrado ser importante en la predicción del riesgo de demencia (Kerwin *et al.*, 2011), una medida más específica de la adiposidad (por ejemplo la circunferencia de la cintura, el porcentaje de grasa corporal y el grosor del pliegue cutáneo) puede predecir de una manera mucho mejor el riesgo de tener EA (Thirunavu *et al.*, 2019). Un incremento en el porcentaje de grasa visceral fue observado en los animales que consumieron manteca al ser disectados, por lo que se le puede atribuir a este factor el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa. Importantemente, un incremento en la carga de péptidos y placas A β se ha relacionado a un aumento en la fosforilación de la proteína tau, un segundo marcador patológico de la enfermedad (Gomes *et al.*, 2019), un fenómeno que de igual forma fue observado en nuestro trabajo. Tanto el incremento de la expresión del péptido A β como de p-tau a base de una dieta alta en grasas, son resultados consistentes con ratones a los cuales se les dio una dieta hipercalórica a base de grasas a corto plazo (Nakandakari *et al.*, 2019). Sin embargo, los resultados reportados por Walker *et al.*, (2018) difieren a los encontrados en este trabajo, ya que ellos encuentran que al utilizar ratones transgénicos APP/PSEN1 alimentados durante 9 meses con una dieta alta en grasas no existen cambios en la expresión tanto de A β como de p-tau. Muchos estudios han concluido que las interacciones entre A β y las membranas celulares contribuyen a la toxicidad y muerte celular observada en la EA. Por otro lado, los resultados correspondientes al tratamiento con teobromina fueron positivos al reducir los marcadores más importantes de la EA.

Debido a que la generación del péptido A β de 42 aminoácidos depende de la escisión de proteasas como la α -, β -, y γ -secretasas, se evaluó la expresión de dichas enzimas mediante *Western Blot* y fueron semi-cuantificadas para el análisis estadístico. Los resultados con respecto a la expresión de la α -secretasa (ADAM-10) nos indicaron que no hubo diferencia significativa entre grupos, lo que nos dice que la dieta y el tratamiento con teobromina no generan ningún efecto sobre esta enzima involucrada en la vía no amiloidogénica. Por otro lado, un aumento

significativo en la expresión de BACE1 (enzima con acción de β -secretasa) y PSEN-1 (enzima que pertenece al complejo γ -secretasa) en la corteza frontal de animales con dieta alta en grasas (DEG) fue demostrado, mientras que no se observó ningún cambio cuando los animales fueron tratados con teobromina en la expresión de ambas enzimas. Respecto a estas observaciones, la ruta de mayor generación de péptidos $A\beta_{1-42}$ (vía amiloidogénica) está relacionada a la actividad de las enzimas β - y γ -secretasas (Lanni *et al.*, 2019). Similarmente, en otro estudio se demostró que la obesidad inducida en ratas durante un periodo de 4 meses incrementaba la expresión génica de BACE1 en hipocampo (Mohamed *et al.*, 2018), sin embargo lo observado en este trabajo fue un incremento en la expresión proteica de BACE1. Sin embargo, otro trabajo evaluó el efecto de la dieta alta en grasas sobre un modelo transgénico APP/PS1 durante 3 meses. En dicho estudio se encontraron resultados similares como el incremento de triglicéridos plasmáticos, o no haber cambios en los niveles de colesterol en sangre y la expresión de APP; sin embargo también se reportan resultados que difieren con los nuestros ya que encontraron una reducción de la expresión de ADAM y ninguna alteración en la expresión de BACE1 (Ettcheto *et al.*, 2016). Cabe destacar que son modelos totalmente diferentes, ya que el modelo utilizado por nuestro grupo de trabajo se asemeja más a las características de vida de una persona, mientras que el modelo transgénico ya posee desde nacimiento la enfermedad.

Adicionalmente, logramos encontrar en este trabajo que la teobromina previene la expresión de las secretasas amiloidogénicas BACE1 y PSEN1 en la corteza frontal de ratas con obesidad inducida por dieta. Un estudio realizado con pacientes que tenían deterioro cognitivo medio (DCM) evaluó el efecto del consumo de teobromina o cafeína por 12 meses sobre los niveles de $A\beta_{42}$ en líquido cefalorraquídeo. Curiosamente, una correlación positiva fue reportada entre los niveles plasmáticos y cefalorraquídeos del péptido amiloide y la teobromina, mientras que la cafeína no tuvo efecto sobre los niveles en líquido cefalorraquídeo (Travassos *et al.*, 2015).

Como se mencionó, el principal constituyente de las MNF es la forma hiperfosforilada de la proteína tau axonal, mientras que el mayor constituyente de las placas seniles es el péptido A β ₄₂. Las placas seniles o placas A β son agregados extracelulares que corresponden a la deposición de péptidos A β de 42 aminoácidos, derivados de la escisión de la APP por las proteasas ADAM y BACE, los cuales son exportados del cerebro al líquido cefalorraquídeo o de manera local son degradados por la microglía, el principal constituyente del sistema inmune innato del cerebro (Heneka *et al.*, 2015).

En la patofisiología de la EA, un evento clave es la neuroinflamación en el SNC, en donde tanto células de microglía como astrocitos reactivos liberan factores inflamatorios que amplifican la respuesta inmune innata inicial al estar en contacto con el péptido A β . Bajo condiciones patológicas o de estrés oxidativo, estas células regulan la expresión de diferentes marcadores de superficie como el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) y los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs), que producen citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, INF- γ y TNF- α , además de que también sintetizan factores citotóxicos de corta duración, como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Guzmán-Martínez *et al.*, 2019). En este trabajo se analizó la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6, y TNF- α en el modelo de la EA desarrollado por dieta alta en grasas, además del efecto de la teobromina sobre dichos marcadores pro-inflamatorios. Los resultados demostraron que la dieta enriquecida en manteca de cerdo (DEG) ocasionó un proceso inflamatorio en corteza frontal al encontrar aumentadas dichas citoquinas. Los resultados de este trabajo son consistentes con los reportados por Liu *et al.*, (2016), al encontrar estas citoquinas elevadas en un modelo transgénico APP^{swe}/PS1 Δ 9. Por otro lado, un estudio reciente evaluó marcadores de inflamación en el hipotálamo de ratones C57BL6 alimentados con dieta alta en grasas durante 2 meses, encontrando resultados similares a los que observamos en nuestro modelo (Mao *et al.*, 2019).

Se sabe que durante un proceso de obesidad se puede generar resistencia a la insulina, factor relacionado a la diabetes. En el SNC, la insulina regula varios eventos biológicos críticos que ocurren en las neuronas, la glía, la microglía y la unidad neurovascular; además de que una resistencia a la insulina conlleva al deterioro de la plasticidad estructural y funcional, y contribuye al desarrollo de disfunciones neuronales y cerebrales (Bomba *et al.*, 2019). En otro estudio se evaluó el efecto de una dieta alta en grasas sobre marcadores patológicos de la EA en ratones transgénicos APP/PS1, así como la expresión de genes involucrados en la señalización de insulina, llegando a la conclusión de que la dieta alta en grasas afecta la señalización de insulina y se acompaña de un incremento en la generación del péptido A β 42 en hipocampo (Petrov *et al.*, 2015).

No obstante, en nuestro modelo se puede relacionar el aumento de las citocinas pro-inflamatorias al proceso de obesidad que se encuentra ligado a la resistencia a insulina. La obesidad, como se mencionó, se caracteriza por tener un proceso inflamatorio crónico de grado lento, el cual impacta todos los tejidos y órganos, entre ellos el páncreas. Las células β -pancreáticas son activadas por estas citoquinas pro-inflamatorias a través de sus respectivos receptores, promoviendo la activación de la vía NF κ B/I κ B α que estimula una condición pro-inflamatoria; sin embargo, el desequilibrio en los nutrientes (hiperglucemia o hiperlipidemia) también puede activar rutas inflamatorias en las células pancreáticas, y ambos procesos conllevan al daño del DNA que se traduce en una deficiencia en la síntesis de insulina y un incremento en la producción de ROS, por lo tanto, altos niveles sistémicos de glucosa y lípidos. Al haber hiperglucemia, hiperlipidemia y una inflamación sistémica se promueve la agregación de A β en cerebro, que en conjunto con una reducción de insulina se disminuye el transporte y la utilización de glucosa en cerebro vía daño de la señalización de insulina. Y por último, al promoverse la generación del péptido amiloide se activan las células de microglía, produciendo diversas citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10), y especies reactivas

de oxígeno y nitrógeno, que conducen a un proceso neuroinflamatorio (Verdile *et al.*, 2015).

Aunado a esto, se evaluó el efecto de la teobromina sobre la expresión de estas citocinas en la corteza frontal, encontrando reducción simultánea tanto de las citoquinas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. Esto es consistente con los resultados anti-inflamatorios reportados de esta metilxantina, debido a que redujo los niveles de TNF- α en cultivo de células de glioblastoma; así como en vías respiratorias (Cova *et al.*, 2019; Oñatibia-Astibia *et al.*, 2017). Dichos efectos positivos pueden deberse a que las metilxantinas, en este caso la teobromina, son inhibidores selectivos no competitivos de fosfodiesterasas, por lo que se promueve la activación de la proteína cinasa A (PKA) por medio del cAMP, inhibiendo la síntesis de TNF- α y de leucotrienos (Cova *et al.*, 2019).

Como último punto se evaluó la interacción de la teobromina con los receptores de adenosina subtipo A_{2A} (A_{2A}R) mediante técnicas de química computacional. Para ello se diseñó la estructura de la teobromina y el estado de protonación (pH=8.0) mediante el software MarvinSketch y se insertó al programa Maestro, donde previamente se había insertado el receptor en estructura cristalográfica obtenido de la base de datos del Protein Data Bank (PDB 3QAK). En este programa pudimos evaluar las diferentes interacciones entre ligando-receptor, observando que la teobromina tuvo interacciones de tipo puente de Hidrógeno y π - π ; además de que la teobromina se encuentra rodeada por varios residuos de aminoácidos hidrofóbicos como Ala63, Ile66, Val84, Leu85, Met177, Trp246, Leu249, Met270 e Ile279. Por lo tanto, dentro del sitio ortostérico del receptor A_{2A}, el núcleo de xantina del ligando (teobromina) se intercala entre dos partes hidrofóbicas de la proteína, además de tener interacciones de puente de Hidrógeno con la Asn253 e interacciones π - π del núcleo de xantina con la Phe168, lo que ocasiona que se dé una interacción mayor entre ligando-receptor. Estos resultados son similares a los reportados en el estudio reciente donde se evaluó la interacción de cafeína y teofilina con los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, y se reporta que existe una

interacción de puente de H de estos ligandos con los residuos Asn254 (en los receptores A₁) o Asn253 (en receptores A_{2A}); sin embargo en dicho estudio no se reporta la interacción $\pi-\pi$ que nosotros encontramos (Cheng *et al.*, 2019). Los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} están altamente conservados, por lo que no difieren demasiado en su estructura cristalográfica. Esto sugiere que las interacciones de las metilxantinas con los grupos hidrofóbicos son de mayor importancia que el puente de H que se produce con la Asparagina; en adición de la interacción covalente de tipo $\pi-\pi$ que presenta la teobromina con los receptores A_{2A}.

En relación a lo anterior, los receptores purinérgicos de tipo A_{2A} se expresan en la mayor parte del cerebro y en todas las células cerebrales, incluyendo las neuronas y las células gliales. La señalización de los receptores A_{2A} es responsable por varios aspectos importantes de la activación microglial y astrogial, incluyendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Ferretti *et al.*, 2018); la retracción de procesos microgliales (Orr *et al.*, 2009), y la inducción de factores anti-inflamatorios como iNOS, IL-6 y COX2 (Franco y Navarro, 2018). Se conoce que una sobre-regulación de los receptores A_{2A} ocasiona procesos inflamatorios y puede llevar a enfermedades neurodegenerativas (Nedeljkovic, 2019). Además de la alteración en la expresión de este receptor, los eventos patológicos, como la EA, inducen una ganancia de función de la señalización de A_{2A}R. En estas condiciones, los A_{2A}Rs forman complejos de iso- y heteroreceptores con otras proteínas de membrana e interfiere con otras cascadas de señalización intracelular; así que, los isocomplejos funcionales A_{2A}R-A_{2B}R y A₁R-A_{2A}R, además de los heteroreceptores A_{2A}R- α -sinucleína, A_{2A}R-D₂R, A_{2A}R-D₂R-NMDA, A_{2A}R-mGluR5 y A_{2A}R-CB₁R, se han demostrado en la actividad de los astrocitos y microglía, por lo que pueden ser relevantes para múltiples neuropatologías (Borrotto-Escuela *et al.*, 2018). Adicionalmente, se reportó por primera vez una sobreexpresión de receptores de adenosina A_{2A}R en neuronas de personas envejecidas, lo cual se encuentra agravado en pacientes con EA, lo cual fue acompañado con un incremento de la activación del receptor NMDA, dependiente del receptor mGluR5 y ligado a una

mayor entrada de Ca^{2+} (Temido-Ferreira *et al.*, 2018), lo cual hipotéticamente puede ser disminuido al utilizar un antagonista como teobromina que, como se evaluó en este trabajo, tiene fuertes interacciones con este receptor.

Finalmente, como una propuesta de mecanismo, la teobromina reduce los niveles del péptido $\text{A}\beta_{42}$ debido a que puede disminuir la expresión de las secretasas BACE1 y PSEN1, que se encontraron elevadas en nuestro modelo inducido por obesidad. Como resultado de dichos hallazgos, puede ser argumentado que por decremento del péptido $\text{A}\beta$, el estrés oxidativo y las marañas neurofibrilares son simultáneamente reducidas, las cuales son producidas por consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína tau. Del mismo modo, la teobromina no altera la expresión de ADAM10, por lo que la vía no amiloidogénica no se ve alterada. Además, puede decirse que gran parte de los mecanismos observados en este trabajo fueron positivos para teobromina. De manera importante se puede deducir que los mecanismos anti-inflamatorios se pueden deber a la interacción de la teobromina con los receptores de adenosina A_2AR , que en parte se expresan mayoritariamente en neuronas y células microgliales y astrogiales; o a la reducción de la excitotoxicidad generada por la interacción de estos receptores con otros receptores, principalmente de glutamato.

9. CONCLUSIONES

- Se logró reproducir, en ratas *Wistar*, el modelo murino de la EA inducido con dieta alta en grasas con las características cognitivas y de memoria características en los modelos transgénicos.
- La dieta enriquecida en grasas, administrada durante un periodo largo, ocasionó deterioros cognitivo y de memoria de corto y largo plazo en los animales, y los resultados al administrar teobromina indicaron un efecto neuroprotector.
- Se obtuvo un aumento de la expresión del péptido A β ₄₂ y de placas amiloideas en la corteza frontal de animales alimentados con dieta enriquecida en grasas, mientras que con el tratamiento con teobromina no hubo cambio al compararlos con el control.
- La Proteína Precursora de amiloide (APP) permaneció sin cambios en todos los grupos analizados.
- La expresión en corteza frontal de la proteasa no amiloidogénica ADAM10 se mantuvo constante.
- La expresión de enzimas amiloidogénicas (BACE1 y PSEN1) se incrementó en el modelo generado, y el grupo de ratas tratado con teobromina no presentó diferencia significativa con el control.
- Se observó aumento del intervalo de la proteína tau total con respecto a p-tau en los animales con DEG.
- Las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α aumentaron significativamente en la corteza frontal de los animales alimentados con grasas, y la teobromina indujo efecto anti-inflamatorio.
- La citocina anti-inflamatoria IL-10 no se alteró con el tratamiento con teobromina, sin embargo, con la dieta alta en grasas se incrementó significativamente.
- Las interacciones analizadas entre la teobromina y los receptores A_{2A} son de tipo puente de Hidrógeno, hidrofóbicas y π - π .

En conclusión, la obesidad y las dietas altas en grasas han sido ampliamente relacionadas a la EA; sin embargo, la EA es una patología multifactorial en la cual los mecanismos fisiopatológicos no han sido comprendidos. Cabe destacar que en este trabajo se proponen algunos efectos positivos de la teobromina en la EA de tipo esporádico inducida por dieta alta en grasas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

10. REFERENCIAS

- Aliev G, Li Y, Palacios HH, Obrenovich ME. 2011.** Oxidative stress induced mitochondrial DNA deletion as a hallmark for the drug development in the context of the cerebrovascular diseases. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 6:222-241.
- Alzheimer's Disease International (ADI). 2018.** World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research: New frontiers. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>
- Ashihara H, Sano H, Crozier A. 2008.** Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 69:841–856.
- Barage SH, Sonawane KD. 2015.** Neuropeptides Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 52:1–18.
- Barupal DK, Baillie R, Fan S, Saykin AJ, Meikle PJ, Arnold M, Nho K, Fiehn O, Kaddurah-Daouk R. 2019.** Alzheimer Disease Metabolomics Consortium. *Alzheimers Dement.* 11:619-627.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. 2009.** 4a edición. Alemania: Editorial Springer-Verlag, 640.
- Bell KFS, Bennett DA, Cuello AC. 2007.** Paradoxical Upregulation of Glutamatergic Presynaptic Boutons during Mild Cognitive Impairment. *Neurobiol. Dis.* 27:10810–10817.
- Bengoetxea X, Rodriguez-Perdigon M, Ramirez MJ. 2015.** Object recognition test for studying cognitive impairments in animal models of Alzheimer's disease. *Front. Biosci.* 7:10-29.

- Ben-Haim L, Carrillo-de Sauvage M, Ceyzériat K, Curtin JF. 2015.** Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9:1–27.
- Bobba A, Amadoro G, Valenti D, Corsetti V, Lassandro R, Atlante A. 2013.** Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion.* 13:298–311.
- Boison D. 2011.** Modulators of Nucleoside Metabolism in the Therapy of Brain. *Curr. Top. Med. Chem.* 11:1068–1086.
- Bomba M, Granzotto A, Castelli V, Onofri M, Lattanzio R, Cimini A, Sensi SL. 2019.** Exenatide Reverts the High-Fat-Diet-Induced Impairment of BDNF Signaling and Inflammatory Response in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 70(3):793-810.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A. 2010.** Activation of Extrasynaptic, But Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- β Production. *J Neurosci.* 30:15927–15942.
- Borroto-Escuela DO, Hinz S, Navarro G, Franco R, Müller CE, Fuxe K. 2018.** Understanding the Role of Adenosine A2AR Heteroreceptor Complexes in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *Front. Neurosci.* 12:43.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- de Bruijn RF, Ikram MA. 2014.** Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer ' s disease. *BMC Med.* 12:1–9.

- Bruneton J. 2001.** Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2ª edición. España: Editorial ACRIBIA; 1059-1069.
- Bruno V. 2000.** Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology*. 39:2223–2230.
- Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E. 2014.** Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease : A key role for oxidative stress in brain. *Biochem. Biophys. Acta*. 1842:1693–1706.
- Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. 2015.** The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet. Med*. 1:1–10.
- Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verger DK, Dickson A, Mamcarz M, Zhang C, Mori T, Arendash GW, Holtzman DM, Potter H. 2009.** Caffeine suppresses β -amyloid levels in plasma and brain of Alzheimer's transgenic mice. *J Alzheimers Dis*. 17(3):681-697.
- Chen JF, Chern Y. 2011.** Impacts of Methylxantines and Adenosine Receptors on Neurodegeneration: Human and Experimental Studies. Methylxanthines: Handbook of Experimental Pharmacology. 1ª edición. Berlín. Editorial Springer-Verlag. 267-310.
- Chen Z, Zhong C. 2014.** Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 30:271–281.
- Cheng RKY, Segala E, Robertson N, Deflorian F, Doré AS, Errey JC, Fiez-Vandal C, Marshall FH, Cooke RM. 2019.** Structures of Human A1 and A2A Adenosine Receptors with Xanthines Reveal Determinants of Selectivity. *Structure*. 25(8):1275-1285.
- Chu LW. 2012.** Alzheimer's disease : early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*. 18:228–237.

- Ciruela F**, Gómez-Soler M, Guidolin D, Borroto-Escuela DO, Agnati LF, Fuxe K, Fernández-Dueñas V. **2011**. Adenosine receptor containing oligomers : Their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. *BBA - Biomembr.* 1808:1245–1255.
- Cova I**, Leta V, Mariani C, Pantoni L, Pomati S. **2019**. Exploring cocoa properties: is theobromine a cognitive modulator? *Psychopharmacol.* 236(2):561-572.
- D'Antoni S**, Berretta A, Seminara G, Longone P, Giuffrida-Stella AM, Battaglia G, Sortino MA, Nicoletti F, Catania MV. **2011**. A prolonged pharmacological blockade of type-5 metabotropic glutamate receptors protects cultured spinal cord motor neurons against excitotoxic death. *Neurobiol. Dis.* 42:252–264.
- Detlev B.** **2008**. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 8:2–7.
- Dias IHK**, Polidori MC, Griffiths HR. **2014**. Hypercholesterolaemia-induced oxidative stress at the blood – brain barrier. *Biochem. Soc. Trans.* 42:1001–1005.
- Dominguez RO**, Pagano MA, Marschoff ER, Gonzalez SE, Repetto MG, Serra JA. **2014**. Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurologia* 29:567–572.
- Du H**, Guo L, Yan S, Sosunov AA, Mckhann GM, Shidu S. **2010**. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *PNAS.* 107: 18670–18675.
- Ettcheto M**, Petrov D, Pedrós I, Alva N, Carbonell T, Beas-Zarate C, Pallas M, Auladell C, Folch J, Camins A. **2016**. Evaluation of Neuropathological Effects of a High-Fat Diet in a Presymptomatic Alzheimer's Disease Stage in APP/PS1 Mice. *J. Alzheimers Dis.* 54(1):233-51.
- Evin G**, Weidemann A. **2002**. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β -amyloid peptides. *Peptides.* 23:1285–1297.

- Fernández-Fernández L**, Esteban G, Giralt M, Valente T, Bolea I, Solé M, Sun P, Benítez S, Morelló JR, Reguant J, Ramírez B, Hidalgo J, Unzeta M. **2015**. Catecholaminergic and cholinergic systems of mouse brain are modulated by LMN diet, rich in theobromine, polyphenols and polyunsaturated fatty acids. *Food Funct.* 6:1251–1260.
- Ferretti R**, Moura EG, Dos Santos VC, Caldeira EJ, Conte M, Matsumura CY, Pertille A, Mosqueira M. **2018**. High-fat diet suppresses the positive effect of creatine supplementation on skeletal muscle function by reducing protein expression of IGF-PI3K-AKT-mTOR pathway. *PLoS One.* 13(10):e0199728.
- Francis PT**, Parsons CG, Jones RW, Francis PT. **2012**. Rationale for combining glutamatergic and cholinergic approaches in the symptomatic treatment of Alzheimer ' s disease. *Expert Rev Neurother.* 12:1351–1365.
- Francis PT**. **2003**. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 18:S15–S21.
- Franco R**, Navarro G. **2018**. Adenosine A2A Receptor Antagonists in Neurodegenerative Diseases: Huge Potential and Huge Challenges. *Front. Psychiatry.* 9:68.
- Gamba P**, Testa G, Gargiulo S, Staurengi E, Poli G, Leonarduzzi G. **2015**. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 7:1–21.
- García S**, Coral-Vázquez R, Meza Dávalos E, Lucino-Castillo J, Martínez-Silva B, Villagómez-Ortíz A. **2009**. Enfermedad de Alzheimer: una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular. *Med Int Mex.* 25(4):300-312.
- Godoy JA**, Rios JA, Zolezzi JM, Braidly N, Inestrosa NC. **2014**. Signaling pathway cross talk in Alzheimer ' s disease. *Cell Comun. Signal.* 12:1–12.

- Gomes** LA, Hipp SA, Rijal-Upadhaya A, Balakrishnan K, Ospitalieri S, Koper MJ, Largo-Barrientos P, Uytterhoeven V, Reichwald J, Rabe S, Vandenberghe R, von Arnim CAF, Tousseyn T, Feederle R, Giudici C, Willem M, Staufenbiel M, Thal DR. **2019**. A β -induced acceleration of Alzheimer-related τ -pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathol.* 1-29.
- Grijalba** MT, Vercesi AE, Schreier S. **1999**. Ca²⁺-Induced Increased Lipid Packing and Domain Formation in Submitochondrial Particles . A Possible Early Step in the Mechanism of Ca²⁺-Stimulated Generation of Reactive Oxygen Species by the Respiratory Chain. *Biochemistry.* 38:13279–13287.
- Gugliandolo** A, Bramanti P, Mazzon E. **2017**. Role of Vitamin E in the Treatment of Alzheimer's Disease: Evidence from Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* 18(12):pii: E2504.
- Guzman-Martinez** L, Maccioni RB, Andrade V, Navarrete LP, Pastor MG, Ramos-Escobar N. **2019**. Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. *Front. Pharmacol.* 10:1008.
- Haass** C, Selkoe DJ. **2007**. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Mol. Cell Biol.* 8:302–312.
- Hamilton** A, Esseltine JL, Devries RA, Cregan SP, Ferguson SSG. **2014**. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Brain.* 7:1–12.
- Hane** F, Drolle E, Gaikwad R, Faught E, Leonenko Z. **2011**. Amyloid- β aggregation on model lipid membranes: an atomic force microscopy study. *J Alzheimers Dis.* 26(3):485-94.
- Harris** E, Schulzke SM, Patole SK. **2010**. Pentoxifylline in Preterm Neonates A Systematic Review. *Pediatr. Drugs.* 12:301–311.

- Hascup** ER; Broderick SO; Russell MK; Fang Y; Bartke A; Boger HA; Hascup KN. **2019**. Diet-induced insulin resistance elevates hippocampal glutamate as well as VGLUT1 and GFAP expression in A β PP/PS1 mice. *J. Neurochem.* 148(2): 219-237.
- Hassanzadeh** G, Hosseini A, Pasbakhsh P, Akbari M. **2015**. Trimetazidine Prevents Oxidative Changes Induced in a Rat Model of Sporadic Type of Alzheimer's Disease. *Acta Med. Iran.* 53:17–24.
- Heneka** MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. **2015**. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet. Neurol.* 14:388–405.
- Heneka** MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. **2010**. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 117:919–947.
- Holtzman** DM, Herz J, Bu G. **2012**. Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2:1–23.
- Hussain** I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G. **1999**. Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as β -Secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 427:419–427.
- Isik** AT. **2010**. Late onset Alzheimer's disease in older people. *Clin. Interv. Aging.* 5:307–311.

- Jeong** MY, Jang HM, Kim DH. **2019**. High-fat diet causes psychiatric disorders in mice by increasing Proteobacteria population. *Neurosci. Lett.* 698:51-57.
- Johnson** IM, Prakash H, Prathiba J, Raghunathan R, Malathi R. **2012**. Spectral Analysis of Naturally Occurring Methylxanthines (Theophylline, Theobromine and Caffeine) Binding with DNA. *PLoS One.* 7:1–11.
- Kachooei** E, Moosavi-Movahedi AA, Khodaghali F, Ramshini H, Shaerzadeh F, Sheibani N. **2012**. Oligomeric Forms of Insulin Amyloid Aggregation Disrupt Outgrowth and Complexity of Neuron-Like PC12 Cells. *PLoS One.* 7:1–9.
- Kalra** J, Khan A. **2015**. Reducing A β load and tau phosphorylation: Emerging perspective for treating Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 764:571–581.
- Kapogiannis** D, Mattson MP. **2011**. Perturbed Energy Metabolism and Neuronal Circuit Dysfunction in Cognitive Impairment. *Lancet Neurol.* 10:187–198.
- Karch** CM, Goate AM. **2015**. Review Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biol. Psychiatry.* 77:43–51.
- Kerwin** DR, Gaussoin SA, Chlebowski RT, Kuller LH, Vitolins M, Coker LH, Kotchen JM, Nicklas BJ, Wassertheil-Smoller S, Hoffmann RG, Espeland MA. **2011**. Interaction between body mass index and central adiposity and risk of incident cognitive impairment and dementia: results from the Women's Health Initiative Memory Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 59(1):107-12.
- Kew** JNC, Kemp JA. **2005**. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology.* 179:4–29.
- Khan** N, Monagas M, Casas R, Estruch R. **2012**. Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22:1046–1053.

- Kim J**, Onstead L, Randle S, Price R, Smithson L, Zwizinski C, Dickson DW, Golde T, McGowan E. **2007**. AB40 Inhibits Amyloid Deposition In Vivo. *Neurobiol. Dis.* 27:627–633.
- Kim J**, Yoon H, Basak J, Kim J. **2014**. Apolipoprotein E in Synaptic Plasticity and Alzheimer ' s Disease : Potential Cellular and Molecular Mechanisms. *Mol. Cells.* 37:767–776.
- Kothari V**; Luo Y; Tomabene T; O'Neill AM; Greene MW; Geetha T; Babu JR. **2017**. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863(2):499-508.
- Kumar A**, Dhull DK, Mishra PS, Ferguson S. **2015**. Therapeutic potential of mGluR5 targeting in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 9:1–9.
- Kuret J**, Chirita CN, Congdon EE, Kannanayakal T, Li G, Necula M, Yin H, Zhong Q. **2005**. Pathways of tau fibrillization. *Biochem. Biophys. Acta.* 1739:167–178.
- Lanni C**, Fagiani F, Racchi M, Preda S, Pascale A, Grilli M, Allegri N, Govoni S. **2019**. Beta-amyloid short- and long-term synaptic entanglement. *Pharmacol. Res.* 139:243-260.
- Lim**, WLF, Martins IJ, Martins RN. **2014**. The Involvement of Lipids in Alzheimer's Disease. *J. Genet. Genomics.* 41:261–274.
- Lipton SA**. **2007**. Pathologically-Activated Therapeutics for Neuroprotection : Mechanism of NMDA Receptor Block by Memantine and S-Nitrosylation. *Curr. Drug Targets.* 8:621–632.
- Lim WLF**, Martins IJ, Martins RN. **2014**. The involvement of lipids in Alzheimer's Disease. *J. Genet. Genomics.* 41:261-274.
- Liu CC**, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. **2013**. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 9:106–18.

- Liu ZJ, Li ZH, Liu L, Tang WX, Wang Y, Dong MR, Xiao C. 2016.** Curcumin Attenuates Beta-Amyloid-Induced Neuroinflammation via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Function in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Front. Pharmacol.* 7:261.
- Luque-Contreras D, Carvajal K, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Campos-Peña V. 2014.** Oxidative Stress and Metabolic Syndrome : Cause or Consequence of Alzheimer's Disease? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1:1–11.
- Maesako M; Uemura M; Tashiro Y; Sasaki K; Watanabe K; Noda Y; Ueda K; Asada-Usugi M; Kubota M; Okawa K; Ihara M; Shimohama S; Uemura K; Kinoshita A. 2015.** High Fat Diet Enhancers β -Site Cleavage of Amyloid Precursor Protein (APP) via Promoting β - Site APP Ceaving Enzyme 1/Adaptor Protein 2/Clathrin Complex Formation. *Plose one.* 10(9):e0131199.
- Malherbe P, Kew JNC, Richards JG, Faull RLM, Kemp JA, Kratzeisen C, Mutel V. 2002.** Identification and characterization of a novel splice variant of the metabotropic glutamate receptor 5 gene in human hippocampus and cerebellum. *Mol. Brain Res.* 109:168–178.
- Mao L, Hochstetter D, Yao L, Zhao Y, Zhou J, Wang Y, Xu P. 2019.** Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) Attenuates Neuroinflammation in Palmitic Acid-Stimulated BV-2 Microglia and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 20(20):E5081.
- Martínez-Pinilla E, Oñatibia-Astibia A, Franco R. 2015.** The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Front. Pharmacol.* 6:1–5.
- Mazanetz MP, Fischer PM. 2007.** Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6:464–479.

- Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Lo Bello M. 2015.** Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 82:10–18.
- Mena-López R, Luna-Muñoz J, García-Sierra F, Hernández-Alejandro M. 2010.** Histopatología molecular de la enfermedad de alzheimer. *Rev. Digit. Univ. UNAM.* 1:1–12.
- Mendiola-Précoma JC. 2015.** Cambios inducidos por teobromina en la expresión y distribución del receptor purinérgico A1 en el encéfalo de un modelo de ratas para Alzheimer. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químico-Biológicas.
- Mendiola-Precoma J, Berumen LC, Padilla K, Garcia-Alcocer G. 2016.** Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomed. Res.* 2016:2589276.
- Mendiola-Precoma J; Padilla K; Rodríguez-Cruz A; Berumen LC; Miledi R; García-Alcocer G. 2017.** Theobromine-Induces Changes in A1 Purinergic Receptor Gene Expression and Distribution in a Rat Brain Alzheimer's Disease Model. *J. Alzheimers Dis.* 55(3):1273-1283.
- Miyakawa T. 2010.** Vascular pathology in Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics.* 10:39–44.
- Mohamed HE, Abo-ELmatty DM, Mesbah NM, Saleh SM, Ali AA, Sakr AT. 2018.** Raspberry ketone preserved cholinergic activity and antioxidant defense in obesity induced Alzheimer disease in rats. *Biomed. Pharmacother.* 107:1166-1174.
- Mokry J, Nosalova G, Mokra D. 2009.** INFLUENCE OF XANTHINE DERIVATIVES ON COUGH. *J. Physiol. Pharmacol.* 60:87–91.
- Movsesyan VA, Leary DMO, Fan LEI, Bao W, Mullins PGM, Knoblach SM, Faden AI. 2001.** mGluR5 Antagonists 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine and (E)-

2-Methyl-6- (2-phenylethenyl)-pyridine Reduce Traumatic Neuronal Injury In Vitro and In Vivo by Antagonizing N-Methyl-D-aspartate Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296:41–47.

Mustard JA. 2015. The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behavior and molecular mechanisms. *Cell Mol. Life Sci.* 71:1375–1382.

Nakandakari SCBR; Muñoz VR; Kuga GK; Gaspar RC; Sant'Ana MR; Paban ICB; Da Silva LGS; Morelli AP; Simabuco FM; Da Silva ASR; De Moura LP; Ropelle ER; Cintra DE; Pauli JR. 2019. Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain Behav. Immun.* 79:284-293.

Nedeljkovic N. 2018. Complex regulation of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and A2AR-mediated adenosine signaling at neurovascular unit: A link between acute and chronic neuroinflammation. *Pharmacol. Res.* 144:99-115.

Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. Molecular Neuropharmacology. 2009. 2ª edición. China: Editorial McGraw Hill, 322-344.

Oddo S. 2014. The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Front. Biosci.* 4:941–952.

Oñatibia-Astibia A, Franco R, Martínez-Pinilla E. 2017. Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 61(6).

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2019. Obesidad. Disponible en: <https://www.who.int/topics/obesity/es/>

Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF. 2009. Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* 12(7):872-8.

Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ. 2002. Type 2 Diabetes, APOE Gene, and the Risk for Dementia and Related Pathologies. *Diabetes.* 51:1256–1262.

Perl DP. 2010. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med.* 77:32–42.

- Petrov D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, Casadesús G, Beas-Zarate C, Carro E, Ferrer I, Vazquez-Carrera M, Folch J, Camins A. 2015.** High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis de fi ciencias contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochem. Biophys. Acta.* 1852(9):1687–1699.
- Prasanthi JR, Dasari B, Marwarha G, Larson T, Chen X, Geiger JD, Ghribi O. 2010.** Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic. Biol. Med.* 49:1212–1220.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. 2015.** The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience.* 307:26–36.
- Querfurth HW, LaFerla FM. 2010.** Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 362:329–344.
- Ramírez-Díaz SP, Albert-Meza G, Ávila-Funes JA, Barrientos-Priego ALH, Besga-Basterra A, Campos-Gallegos G, Casanova-Sánchez I, Copca-Arellano A, Cuéllar-Roque F, D'Hiver-de las Deses C, Del Río-Prado AF, Díaz-Gómez JL, et al.** Enfermedad de Alzheimer Presente y Futuro. 1ª edición. México: Editorial Planeación y Desarrollo, 2011:74-246.
- Reed TT. 2011.** Free Radical Biology & Medicine Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 51:1302–1319.
- Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. 2013.** Glutamate system , amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J. Psychiatry Neurosci.* 38:6–23.
- Ridge PG, Ebbert MTW, Kauwe JSK. 2013.** Genetics of Alzheimer's Disease. *Biomed Res. Int.* 2013:1–13.

- Rizzi L, Rosset I, Roriz-Cruz M. 2014.** Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer's and Vascular Types. *Biomed Res. Int.* 1:1–8.
- Rohn TT. 2013.** Proteolytic Cleavage of Apolipoprotein E4 as the Keystone for the Heightened Risk Associated with Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 14:14908–14922.
- Roy S, Zhang B, Lee VMY, Trojanowski JQ. 2005.** Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 109:5–13.
- Salminen A, Ojala J, Suuronen T, Kaarniranta K, Kauppinen A. 2008.** Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. *J. Cell Mol. Med.* 12:2255–2262.
- Samadi M; Moradi S; Moradinazar M; Mostafai R; Pasdar Y. 2019.** Dietary pattern in relation to the risk of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neurol. Sci.* 40(10):2031-2043.
- Sandhir R, Gupta S. 2015.** Molecular and biochemical trajectories from diabetes to Alzheimer's disease: A critical appraisal. *World J. Diabetes.* 6:1223–1242.
- Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M. 2012.** BACE1 in Alzheimer's disease. *Clin. Chim. Acta.* 414:171–178.
- Selkoe DJ, Schenk D. 2003.** ALZHEIMER'S DISEASE: Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:545–584.
- Shea YF, Chu LW, Chan AOK, Ha J, Li Y, Song YQ. 2015.** A systematic review of familial Alzheimer's disease: Differences in presentation of clinical features among three mutated genes and potential ethnic differences. *J. Formos. Med. Assoc.* 1:1–9.

- Shinohara M**, Sato N, Shimamura M, Kurinami H, Hamasaki T, Chatterjee A, Rakugi H, Morishita R. **2014**. Possible modification of Alzheimer's disease by statins in midlife : interactions with genetic and non-genetic risk factors. *Front. Aging Neurosci.* 6:1–12.
- Sinha S**, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak N, Jewett K, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari S, Wang SM, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V. **1999**. Purification and cloning of amyloid precursor protein b -secretase from human brain. *Nature.* 705:537–540.
- Smith MA**, Nunomura A, Zhu X, Takeda A, Perry G, Al SET. **2000**. Metabolic, Metallic, and Mitotic Sources of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Antioxidants REDOX Signal.* 2:413–420.
- Sosa-Ortiz AL**, Acosta-Castillo I, Prince MJ. **2012**. Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease. *Arch. Med. Res.* 43:600–608.
- Sottero B**, Gamba P, Gargiulo S, Leonarduzzi G, Poli G. **2009**. Cholesterol Oxidation Products and Disease : An Emerging Topic of Interest in Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* 16:685–705.
- Spuch C**, Ortolano S, Navarro C. **2012**. LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in alzheimer's disease. *Front. Physiol.* 3:1–14.
- Streijger F**, Oerlemans F, Ellenbroek BA, Jost CR. **2005**. Structural and behavioural consequences of double deficiency for creatine kinases BCK and UbCKmit. *Behav. Brain Res.* 157:219–234.
- Sugimoto N**, Miwa S, Hitomi Y, Nakamura H. **2014**. Theobromine , the Primary Methylxanthine Found in Theobroma cacao , Prevents Malignant

Glioblastoma Proliferation by Negatively Regulating Kinase, Akt/mammalian Target of Rapamycin Kinase, and Nuclear Factor-Kappa B. *Nutr. Cancer* 63:419–423.

Sun X, Chen WD, Wang YD. 2015. β -Amyloid : the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 6:1–9.

Sun X, Jin L, Ling P. 2012. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov. Ther.* 6:285–290.

Sun X, Wang Y, Qing H, Christensen MA, Liu Y, Zhou W, Tong Y, Xiao C, Huang Y, Zhang S, Liu X, Song W. 2005. Distinct transcriptional regulation and function of the human BACE2 and BACE1 genes. *FASEB J.* 19:739–749.

Supnet C, Bezprozvanny I. 2011. Presenilins function in ER calcium leak and Alzheimer's disease pathogenesis. *Cell Calcium.* 50:303–309.

Temido-Ferreira M, Ferreira DG, Batalha VL, Marques-Morgado I, Coelho JE, Pereira P, Gomes R, Pinto A, Carvalho S, Canas PM, Cuvelier L, Buée-Scherrer V, Faivre E, Baqi Y, Müller CE, Pimentel J, Schiffmann SN, Buée L, Bader M, Outeiro TF, Blum D, Cunha RA, Marie H, Pousinha PA, Lopes LV. 2018. Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A2A receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. *Mol Psychiatry.*

Thirunavu V, McCullough A, Su Y, Flores S, Dincer A, Morris JC, Cruchaga C, Benzinger TLS, Gordon BA. 2019. Higher Body Mass Index Is Associated with Lower Cortical Amyloid- β Burden in Cognitively Normal Individuals in Late-Life. *J. Alzheimers Dis.* 69(3):817-827.

Travassos M, Santana I, Baldeiras I, Tsolaki M, Gkatzima O, Sermin G, Yener GG, Simonsen A, Hasselbalch SG, Kapaki E, Mara B, Cunha RA, Agostinho P, Blennow K, Zetterberg H, Mendes VM, Manadas B, de Mendon A. 2015.

Does Caffeine Consumption Modify Cerebrospinal Fluid Amyloid- β Levels in Patients with Alzheimer's Disease? *J. Alzheimers Dis.* 47(4):1069-78.

Treviño S, Aguilar-Alonso P, Flores Hernandez JA, Brambila E, Guevara J, Flores G, Lopez-Lopez G, Muñoz-Arenas G, Morales-Medina JC, Toxqui V, Venegas B, Diaz A. **2015**. A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse.* 69(9):421-33.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. **2007**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44–84.

Valladolid-Acebes I, Stucchi P, Cano V, Fernández-Alfonso MS, Merino B, Gil-Ortega M, Fole A, Morales L, Ruiz-Gayo M, Del Olmo N. **2011**. High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95(1):80-5.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis J, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. **1999**. Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer ' s Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science.* 286:735–742.

Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC. **2010**. The β -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J. Neurosci.* 29:12787–12794.

Vassar R, Kuhn PH, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC, Lichtenthaler SF. **2014**. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J. Neurochem.* 130:4–28.

- Verdile** G, Keane KN, Cruzat VF, Medic S, Sabale M, Rowles J, Wijesekara N, Martins RN, Fraser PE, Newsholme P. **2015**. Inflammation and Oxidative Stress : The Molecular Connectivity between Insulin Resistance , Obesity , and Alzheimer ' s Disease. *Mediators Inflamm.* 2015:1–17.
- Verri** M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, Venturini L, Ricevuti G, Bongiorno AI. **2012**. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 25:345–353.
- Vingtdeux** V, Marambaud P. **2012**. Identification and biology of a-secretase. *J. Neurochem.* 120:34–45.
- Walker** JM, Dixit S, Saulsberry AC, May JM, Harrison FE. **2018**. Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, β -amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 100:87-98.
- Wang** C, Shi Y, Tang M, Zhang X. **2016**. Isoquercetin Ameliorates Cerebral Impairment in Focal Ischemia Effects in Primary Culture of Rat Hippocampal Neurons and Hippocampal CA1 Region of Rats. *Mol. Neurobiol.* 1:1–17.
- Wang** X, Su B, Lee H, Li X, Perry G, Smith MA. **2009**. Impaired Balance of Mitochondria Fission and Fussion in Alzheimer Disease. *J. Neurosci.* 29:9090–9103.
- Williams** CJ, Dexter DT. **2014**. Neuroprotective and symptomatic effects of targeting group III mGlu receptors in neurodegenerative disease. *J. Neurochem.* 129:4–20.
- Won** H, Lee H, Gee HY, Mah W, Kim J, Lee J, Ha S, Chung C, Jung ES, Cho YS, Park S, Lee J, Lee K, Kim D, Bae YC, Kaang B, Lee MG, Kim E. **2012**.

Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature*. 486:261–265.

Wu X, Wang R, Jiang Q, Wang S, Yao Y. **2014**. Determination of amino acid neurotransmitters in rat hippocampi by HPLC-UV using NBD-F as a derivative. *Biomed. Chromatogr.* 28:459–462.

Xiaoning B. 2010. Alzheimer Disease: Update on Basic Mechanism. *J Am Osteopath Assoc.* 110:S3-S9.

Xu L, Wu X, Li R, Chen K, Long Z, Zhang J, Guo X, Yao L. **2016**. Prediction of Progressive Mild Cognitive Impairment by Multi-Modal Neuroimaging Biomarkers. *J. Alzheimer's Dis.*:1–12.

Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE. **1999**. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*. 2558:533–537.

Yang E, Park GH, Song K. **2013**. Neuroprotective effects of liquiritigenin isolated from licorice roots on glutamate-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells. *Neurotoxicology*. 39:114–123.

Zeidán-Chuliá F, Gelain DP, Kolling EA, Rybarczyk-Filho JL, Ambrosi P, Terra SR, Pires AS, Batista J, Behr GA, Cláudio J, Moreira F. **2013**. Major Components of Energy Drinks (Caffeine, Taurine, and Guarana) Exert Cytotoxic Effects on Human Neuronal SH-SY5Y Cells by Decreasing Reactive Oxygen Species Production. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1:1–22.

Zhang L, Shen C, Chu J, Zhang R, Li Y, Li L. **2014**. Icaritin Decreases the Expression of APP and BACE-1 and Reduces the β -amyloid Burden in an APP Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 10:181–191.