



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“EFECTO NEUROPROTECTOR DE ACEITE DE *PERSEA AMERICANA* EN EL
MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER INDUCIDO POR
BULBECTOMÍA OLFATORIA BILATERAL”**

TESIS

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

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JESSICA JANETTE SAUCEDO MALTOS

DIRIGIDA POR:

DRA. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

QUERÉTARO, QRO. A

ENERO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Efecto neuroprotector de aceite de *Persea americana* en el modelo de la enfermedad de Alzheimer inducido por bulbectomía olfatoria bilateral”

TESIS

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

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICOBIOLOGICAS

PRESENTA:

JESSICA JANETTE SAUCEDO MALTOS

DIRIGIDA POR:

DRA. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

DRA. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

Presidente

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Secretario

DR. JESÚS CARLOS MENDIOLA PRECOMA

Vocal

DR. ANDRÉS QUINTANAR STEPHANO

Suplente

DRA. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
enero 2020
México

"Una búsqueda comienza siempre con la suerte del principiante y termina con la prueba del conquistador".

Paulo Coelho.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto fue elaborado en el laboratorio de Unidad de Investigación Genética del Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas, bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe García Alcocer, gracias por el enorme apoyo e impulso tanto académico como profesional, por confiar en mi trabajo dentro del laboratorio, por sacar el máximo potencial de este proyecto y desde luego ser mi guía y brindarme valiosas enseñanzas a lo largo de estos dos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de la beca durante el período de maestría.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría de la Universidad Autónoma de Querétaro (FOPER) por los recursos económicos otorgados a este proyecto (FOPER-2020).

A mi esposo Alexis por ser mi apoyo incondicional, mi mejor amigo y mi principal motivación, gracias por hacer también tuyo este sueño, por creer en mí y animarme en cada paso para crecer juntos, ahora vamos juntos por el gran sueño de ser papás.

Mi agradecimiento y reconocimiento a mi comité de sinodales, al Dr. Andrés Quintanar Stephano del departamento de Fisiología y Farmacología, por su valiosa aportación en los procedimientos quirúrgicos, sus valiosas enseñanzas, sus asesorías y apoyo académicos al proyecto; a la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, por compartir su gran conocimiento, por su acompañamiento y su apoyo como tutora, gracias por escucharme, por ser un ejemplo para mí y guía en este proceso; a la Dra. Jesica Escobar Cabrera por brindarme su apoyo, por compartir conmigo sus valiosos consejos y asesorías durante este proyecto; finalmente al Dr. Jesús Carlos Mendiola Précoma, gracias por instruirme, por compartir conmigo cada enseñanza y acompañarme en cada paso, por confiar en mí e impulsarme, me siento muy afortunada de haber contado con ese gran apoyo, pero sobre todo gracias por ser un gran ser humano y un gran amigo.

Al M.I.M David Gustavo García Gutiérrez por su apoyo con el uso del equipo para lectura de ELISA.

A mi querida familia en Chihuahua, mis papás y mis hermanos, gracias por su enorme apoyo a la distancia, por creer en mí, por las fuerzas que me han dado siempre, sobre todo durante este periodo de pandemia, por acompañarme con tanto cariño en todo mi camino y por hacer tuyas mis alegrías y dificultades.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Nabi, Carlos, César, Dany, Mireya, Eli, Freddy y Jazmín, gracias por brindarme su amistad, por compartir conmigo sus conocimientos y consejos, por las risas, las conversaciones y todos los momentos recordaré siempre con gran cariño que hicieron que me sintiera como en casa.

ÍNDICE

	Página
Resumen	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Enfermedad de Alzheimer	4
2.2 Prevalencia de la Enfermedad de Alzheimer	4
2.3 Patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer	5
2.4 Neuropatogénesis de la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío	8
2.5 Factores genéticos relacionados a la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío	11
2.6 Factores genéticos asociados a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano	13
2.7 Tipos de memoria y zonas cerebrales implicadas	13
2.8 Fases clínicas de la Enfermedad de Alzheimer	16
2.9 Los síntomas de la demencia en la Enfermedad de Alzheimer	16
2.10 Criterios de diagnóstico para la Enfermedad de Alzheimer	18
2.11 Criterios de prevención para la Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío	20
2.12 Tratamiento para la enfermedad de Alzheimer	21
2.13 Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral (OBX)	24
2.14 El efecto de los ácidos grasos en la disfunción cognitiva de la Enfermedad de Alzheimer en ratas bulbectomizadas	27
2.15 Receptor de serotonina 5-HT _{2C} en la Enfermedad de Alzheimer y el efecto de los AGPI-CL en su expresión	33
3. Justificación	37
4. Pregunta de investigación	38
5. Hipótesis	38
6. Objetivos	39
6.1 Objetivo general	39
6.2 Objetivos específicos	39
7. Materiales y métodos	40
8. Resultados	52
9. Discusión	72
10. Conclusión	85
11. Referencias	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.	10
2. Clasificación de la memoria humana	15
3. Peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados.	29
4. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo.	45
5. Fases de la prueba de laberinto radial de ocho brazos.	47
6. Cambio de peso corporal con respecto al tiempo	53
7. Distribución del laberinto radial de ocho brazos	55
8. Memoria de referencia	56
9. Memoria de trabajo	58
10. Parámetros adicionales del laberinto de ocho brazos	61
11. Fases de prueba de reconocimiento de objeto nuevo	63
12. Índice de reconocimiento de objeto nuevo (NORI, por sus siglas en inglés)	64
13. Análisis semicuantitativo de los niveles de proteína tau	66
14. Determinación de los niveles de parámetros oxidativos	68
15. Determinación de los niveles de expresión del receptor 5HT _{2C}	70
16. Micrografías de la inmunofluorescencia del receptor 5HT _{2C} con Alexa Fluor 488	71

ACRÓNIMOS

EA	Enfermedad de Alzheimer.	PSN	Placas seniles neuríticas.
OMS	Organización Mundial de la Salud.	ONF	Ovillos neurofibrilares.
APO E	Apolipoproteína E.	LCR	Líquido cefalorraquídeo.
APP	Proteína precursora amiloide.	IDO	Indolamina-2, 3- desoxigenasa.
ADN	Ácido desoxirribonucleótido.	GSK3β	Enzima glicógeno sintetasa 3 β .
PSEN2	Presenilina 1.	OB	Bulbos olfatorios.
PSEN1	Presenilina 2.	NOA	Núcleo olfativo anterior.
βA	Péptido beta- amiloide.	EXP	Núcleo cortical anterior de la amígdala.
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.	OBX	Bulbectomía olfatoria bilateral.
ATP	Adenosín trifosfato.	ORN	Neuronas receptoras olfativas.
PET	Tomografía por Emisión de Positrones.	EROs	Especies reactivas del oxígeno.
MRI	Magnetic Resonance Imaging.	AGPI/AGPI-CL	Ácidos grasos poliinsaturados / ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
PiB	Compuesto de Pittsburgh B.	AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
FDG	Compuesto fluorodeoxiglucosa.	SNC	Sistema nervioso central.
DASH	Dietary Approaches to Stop Hypertension.	TNF α	Factor de necrosis tumoral α
FDA	Food and Drug Administration.	ALA	Ácido α linolénico.
NMDA	Compuesto N-Metil-D-aspartato.	DHA	Ácido docohexanóico.
SERT	Proteína transportadora de serotonina.	EPA	Ácido eicosapentanóico.
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina).	IL	Interleucina
		AA	Ácido araquidónico

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

RESUMEN

De acuerdo con la OMS, la Enfermedad de Alzheimer (EA) ha sido identificada, a nivel mundial, como el tipo más común de demencia en adultos mayores a 65 años. Las principales características histopatológicas y bioquímicas de la EA, son la formación de placas seniles amiloides y ovillos neurofibrilares, los cuales conducen a la muerte neuronal, pérdida sináptica y un proceso neuroinflamatorio permanente, además destaca un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, especies reactivas del oxígeno (EROs) y especies nítricas, procesos que a su vez generan daños en las mitocondrias de las neuronas culminando en una disminución del metabolismo energético; así mismo, se presenta pérdida de plasticidad sináptica y daño en la barrera hematoencefálica. En el presente estudio se evaluó el efecto del aceite de *Persea americana* sobre marcadores característicos de la Enfermedad de Alzheimer (EA) en un modelo de ratas bulbectomizadas, representativo de la variante esporádica de la patología, en las que se evaluó el estado cognitivo, mediante la determinación del estado de memoria a corto y largo plazo a través de las pruebas conductuales de reconocimiento de objeto nuevo y laberinto radial de ocho brazos, durante el tratamiento con aceite de *P. americana*. Por otra parte, se determinaron los niveles de la proteína tau mediante la técnica de *western blot*, los niveles de GSH/GSSG y la actividad enzimática de catalasa por ensayo colorimétrico, así como la expresión del receptor de serotonina 2C (5HT_{2C}R) por inmunofluorescencia. Finalmente, los resultados fueron analizados por el método de ANOVA de 2 vías y prueba *Post hoc* Bonferroni.

Palabras clave: (EA) Enfermedad de Alzheimer, (OBX) bulbectomía olfatoria bilateral, (PA) Aceite de *P. americana*, (β A) Péptido beta amiloide, Omega 3, (DHA) Ácido docosahexaenóico, (EPA) Ácido eicosapentaenóico.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a dementia that represents the highest percentage of registered cases worldwide according to the World Health Organization (WHO), and usually occurs in adults over 65 years of age. The main histopathological and biochemical characteristics of AD are the formation of senile amyloid plaques and neurofibrillary tangles, which lead to neuronal death, synaptic loss and an increase of the neuroinflammatory process, an increase in lipid peroxidation levels, reactive oxygen species (ROS) and nitric species; which eventually, cause damage to cellular mitochondria culminating in an energy metabolism decrease; also, occur the loss of synaptic plasticity and damage to the blood brain barrier. In the present study, the effect of *Persea americana* oil on the main characteristic hallmarks of Alzheimer's Disease (AD) was evaluated in a bulbectomized rat model, representative of the sporadic variant of the pathology; in addition, an evaluation of the cognitive state in the animals was carried out by determining the state of short and long-term memory, through behavioral tests: Novel Object Recognition task and eight arm radial test maze. On the other hand, tau levels were determined using the *western blot* technique, GSH / GSSG levels and catalase enzymatic activity by colorimetric assay, as well as the expression of the serotonin receptor 2C (5HT_{2c}R) by immunofluorescence. Finally, the results were analyzed by the 2-way ANOVA method and the Bonferroni *Post hoc* test.

Key words: (EA) Alzheimer's disease, (OBX) bilateral olfactory bulbectomy, (PA) *P. americana* oil, (β A) Amyloid beta peptide, Omega 3, (DHA) Docosahexaenoic acid, (EPA) Eicosapentaenoic acid.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es descrita como una patología neurodegenerativa progresiva e irreversible, que ha sido identificada como el tipo más común de demencia en adultos mayores. De acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la Salud) en el año 2017, la EA representó del 60 al 70 % de los casos registrados, de los cuales se calculó que el 58 % son procedentes de países con ingresos medios/ bajos; el incremento en la incidencia está relacionado con una mayor presencia de enfermedades cardiovasculares y diabetes, así como condiciones socioeconómicas y niveles de educación más bajos que se encuentran presentes en mayor porcentaje en los países con menor desarrollo (Alzheimer's Association, 2020; WHO, 2019; Acosta y cols., 2012).

La EA se caracteriza por la presencia de alteraciones histopatológicas y cambios bioquímicos específicos, tales como la formación de placas seniles amiloideas extracelulares conformadas por el péptido β amiloideo ($A\beta$), ovillos neurofibrilares intracelulares producidos por la hiperfosforilación de la proteína "tau"; pérdida y degeneración de las sinapsis, daño en la barrera hematoencefálica (Chen y Mobley, 2019; Mendiola y cols., 2016), un incremento en el proceso neuroinflamatorio en el que destaca un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, especies reactivas del oxígeno (EROs) y especies nítricas, que a su vez, provocan daño en las mitocondrias celulares culminando en una disminución del metabolismo energético, que eventualmente conduce a la muerte neuronal (Wang y cols., 2017). Se han descrito dos variantes de la EA; la variante esporádica o de inicio tardío, es la más común y que se presenta en personas mayores a 65 años, y representa más del 95 % de los casos reportados; esta variante es de origen multifactorial, debido a que intervienen diversos factores ambientales y metabólicos que en conjunto con una determinada predisposición genética como la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la APO E, juegan un papel importante en el inicio y desarrollo de la patología; por otro lado,

solo del 2-10 % de los casos corresponde a la forma familiar o de inicio temprano (Van Cauwenberghe y cols., 2016; Chakrabarti y cols., 2015; Masters y cols., 2015).

Actualmente como tratamiento para la EA, existen cuatro medicamentos aprobados por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos en Estados Unidos): rivastigmina, galantamina, donepezilo y memantina, los cuales contribuyen a la disminución de algunos de los síntomas de la enfermedad, sin embargo, no son capaces de revertir el daño neurodegenerativo ocasionado por la progresión de la enfermedad (Alzheimer's Association, 2020; Cao y cols., 2020). Así mismo, para el estudio de la EA existen una gran cantidad de modelos *in vivo*, los cuales pueden reproducir de manera parcial las deficiencias cognitivas, conductuales, así como las alteraciones bioquímicas y patológicas características de la EA. En el presente estudio se utilizó el modelo de bulbectomía olfatoria bilateral para reproducir la variante esporádica de la EA, la cual se caracteriza por presentar un importante proceso neuroinflamatorio, acumulación del péptido beta amiloideo e hiperfosforilación de la proteína Tau, así como disfunción en los sistemas de neurotransmisores colinérgico y serotoninérgico (Gulyaeva y cols., 2017).

En años recientes se ha sugerido la ingesta de dietas con adecuado contenido de sustancias antioxidantes y antiinflamatorias que pueden ser utilizadas en la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Kivipelto y cols., 2018; Dong y cols., 2018). Dado que la dieta es uno de los factores de riesgo para desarrollar la EA, la dieta se puede modificar con el objetivo de prevenir procesos neurodegenerativos (Kivipelto y cols., 2018; Solfrizzi y cols., 2017). Entre los principales nutrientes que han demostrado efectos neuroprotectores, se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tales como los omega 3 (Ω 3, LC-AGPI) y sus derivados metabólicos denominados como oxilipinas, que se caracterizan por ejercer un efecto protector frente al proceso neuroinflamatorio característico la EA, debido a que se insertan en la membrana neuronal de las células dañadas deteniendo el daño oxidativo provocado por el proceso de peroxidación lipídica, así mismo se encuentran relacionados con la disminución de

la acumulación del péptido β A en el parénquima cerebral, influyen en la reducción de la expresión de la proteína pro- apoptótica p53, inhibiendo así el proceso de apoptosis y la participan en la modificación de la producción de neurotransmisores, con lo cual, se produce una mejoría en las funciones cognitivas como, el aprendizaje, memoria, sueño, umbral del dolor y termorregulación (Rey y cols., 2018; Lacombe y cols., 2018; Solfrizzi y cols., 2017). Algunos aceites vegetales poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y monoinsaturados (AGMI); entre ellos, destaca el aceite de aguacate Hass (*P. americana*), el cual posee también una importante cantidad de fitoquímicos como carotenoides, tocoferoles y otras vitaminas antioxidantes, además de ácidos grasos monoinsaturados (que constituyen la mayor proporción de 71%) y ácidos grasos poliinsaturados (en un porcentaje de 13%) (Ortiz -Ávila y cols., 2015a; Dreher y Davenport, 2013). Entre los ácidos grasos de mayor importancia, se encuentra el ácido α linolénico, cuyos derivados son el DHA y EPA que son importantes mediadores del proceso inflamatorio; los cuales, en conjunto con la vitamina E (α -tocoferol), poseen un efecto antioxidante, protector y estabilizador de los ácidos grasos que conforman la membrana celular frente a procesos oxidativos (Ortiz-Ávila y cols., 2015b). Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el posible efecto neuroprotector de los componentes del aceite de *P. americana*, sobre los marcadores de neurodegeneración característicos de la enfermedad de Alzheimer en un modelo de rata con bulbectomía olfatoria bilateral.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es reconocida como una enfermedad neurodegenerativa de progresión lenta e irreversible que involucra la pérdida de funciones cognitivas, así mismo ha sido identificada como la causa más común de demencia en adultos mayores. Esta patología fue descrita por primera vez en 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer; recientemente ha adquirido una mayor relevancia, debido a que se ha posicionado como la principal causa de demencia en la población senil y una de las principales causas de muerte a nivel mundial; por lo tanto, se ha convertido en un potencial riesgo para la salud pública. La investigación actual ha revelado una gran cantidad de datos, entre los cuales se destaca el hecho que los cambios neuropatológicos son progresivos y lentos, debido a que comienzan años antes de que aparezcan las primeras manifestaciones clínicas (Alzheimer's Association, 2020; WHO, 2019; Moller y Graeber, 1998).

2.2 Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer

De acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la Salud) en el año 2019, la EA representa del 60 al 70 % de los casos registrados de demencia en adultos mayores de 65 años, así mismo se reportó una estimación de 50 millones de personas que padecen demencia a nivel mundial, de los cuales aproximadamente 58 % son procedentes de países con ingresos bajos/medios. La prevalencia mundial se espera que incremente por encima de 152 millones de individuos enfermos para las próximas tres décadas, de ahí la importancia fundamental avanzar en el conocimiento científico para desarrollar terapias y agentes preventivos para la enfermedad (WHO, 2019; Alzheimer's Association, 2019; Acosta y cols., 2012). En México se estima que existen aproximadamente 800 mil pacientes con demencia y se prevé que la cifra se triplique en las próximas 3 décadas (Mejía- Arango y cols., 2020).

En cuanto a las diferencias raciales y étnicas en la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que la población hispana es 1.5 veces más propensa a presentar la EA que los blancos americanos (Campos y cols., 2013); se cree que este incremento en la incidencia está relacionada con mayor tendencia a enfermedades metabólicas, así como variaciones en aspectos culturales, condiciones socioeconómicas y nivel educativo, de las comunidades hispanas (Alzheimer's Association, 2020); sin embargo, en 2017, en el estudio realizado por Mehta y colaboradores, se reportó que de la prevalencia de EA en la población del continente americano, los latinos mexicanos tienen una menor incidencia que los latinos caribeños (Mehta y cols., 2017).

En el año 2015, se estimó que el impacto económico generado por los costos del tratamiento y atención de la EA a nivel mundial equivale al 1.1% del PIB mundial, siendo aproximadamente \$ 818 mil millones de dólares anuales y se calcula que esta cifra aumentará exponencialmente en las próximas décadas, sin embargo, en países de ingresos medio- bajos el monto destinado a los servicios de atención para la EA ronda en 0.2% del PIB (WHO, 2019). En México, para el cuidado de una persona con demencia, el total estimado del costo *per cápita* es de \$ 6,157 dólares anuales; además, se estima que las familias de los enfermos absorben hasta el 60 % de los gastos generados para el cuidado del paciente (Gutiérrez-Robledo y Arrieta-Cruz, 2015), aunado a que los sistemas de salud pública no incluyen cuidados especializados en casa, políticas de cuidados a largo plazo y servicios de atención especializada en demencia resulta que, estos beneficios son solo accesibles a un reducido porcentaje de la población senil que puede costearlos en el sector privado (Mejía-Arango y cols., 2020).

2.3 Patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer está principalmente caracterizada por cambios histopatológicos a nivel macroscópico como la reducción del volumen de diversas áreas cerebrales provocada por el incremento de atrofia neuronal, específicamente

en las regiones de la corteza cerebral e hipocampo, mientras que cambios microscópicos y bioquímicos, tales como la formación de placas seniles amiloides que son consecuencia de la creciente acumulación del péptido beta amiloide (β A), hiperfosforilación de la proteína tau, alteración en los sistemas de señalización, disminución de la perfusión sanguínea en tejido neuronal como consecuencia de la angiopatía amiloide y disrupción en la barrera hematoencefálica, en conjunto con un déficit en el proceso de aclaramiento cerebral (Chen y Mobley, 2019; Mendiola y cols., 2016); a la par, dichas alteraciones conducen a un proceso inflamatorio neuronal caracterizado por la presencia de hiperreactividad glial, elevados niveles de citocinas proinflamatorias, alteración morfofuncional de las mitocondrias celulares en conjunto con una disminución del metabolismo energético y estrés oxidativo celular (Wang y cols., 2017), eventualmente estas alteraciones conducen a la muerte neuronal y pérdida sináptica en zonas específicas del cerebro, tales como la corteza entorrinal, corteza prefrontal, temporal e hipocampo, que son estructuras relacionadas con funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria (Bastin y cols., 2020; Serra y cols., 2020; Hu y cols., 2012).

Actualmente se conocen dos variantes de la enfermedad. La más común en la población mundial es la denominada como: esporádica o de inicio tardío, que representa más del 95 % de los casos reportados, de los cuales la mayoría corresponde a personas mayores de 65 años; esta variante es de origen multifactorial, en la que intervienen diversos factores ambientales y metabólicos que, en conjunto con una determinada predisposición genética, juegan un papel importante en el inicio y desarrollo de la patogenia. Por otro lado, entre el 2-10 % de los casos está representado por la forma familiar o de inicio temprano de la enfermedad, que está determinada por la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas: presenilina 1 (PSEN 1), presenilina 2 (PSEN 2) y la proteína precursora amiloide (APP), las cuales tienen una participación fundamental en los procesos bioquímicos característicos de las alteraciones presentadas en la EA, dicha variante se puede presentar en grupos de personas

con edades inferiores a 65 años de edad y se observa una progresión más rápida de la disfunción cognitiva en comparación con la variedad esporádica (Van Cauwenberghe y cols., 2016; Chakrabarti y cols., 2015). En la actualidad existe una mayor cantidad de datos que describen la etiología correspondiente a la variante familiar o de inicio temprano en comparación con la variante esporádica, pues se conocen de manera más precisa las mutaciones de origen hereditario en los genes específicos que están expresadas en los pacientes. Sin embargo, cabe mencionar que, en la variante esporádica de la EA, cuya etiología se encuentra determinada por la interacción de múltiples factores de riesgo, aún se desconocen la totalidad de interacciones los diferentes factores, que dan lugar al inicio de la enfermedad (Masters y cols., 2015).

La etiopatogenia de la variante de inicio tardío o esporádica, es multifactorial, debido a que está determinada por la interacción de diversos factores de riesgo, entre ellos, la edad es considerada como el factor de predisposición más importante en la patogenia, debido a que el riesgo a padecer la EA incrementa en edades avanzadas (Guerreiro y Bras, 2015); además, participan otros determinantes como la predisposición genética, la exposición a factores ambientales como metales pesados y otras sustancias neurotóxicas, el manejo de una dieta desequilibrada desde etapas tempranas de la adultez, acompañada de inactividad física que pueden producir cambios metabólicos, los cuales desencadenan en enfermedades como obesidad, hipertensión, diabetes mellitus e hipercolesterolemia, las que también representan un factor de riesgo importante para el desarrollo de la EA. Así mismo, se han encontrado otros factores determinantes de origen social y conductual, tales como frecuencia y duración de episodios depresivos, y un bajo nivel educativo, pues recientemente se ha demostrado que una educación formal, está relacionada con un menor riesgo de padecer la EA, debido al entrenamiento recibido durante el estudio, que permite la construcción de redes cognitivas y su constante estímulo en distintas regiones cerebrales, lo cual ayuda a mejorar funciones de aprendizaje y memoria, así como el incremento de la capacidad para

resolución de problemas (Alzheimer's Association, 2018; Wang y cols., 2017; Mendiola y cols., 2016; Masters y cols. 2015). El estilo de vida de los pacientes (actividad física, dieta, enfermedades metabólicas) como la exposición a agentes neurotóxicos ambientales pueden tener una fuerte influencia sobre cambios que ocurren a nivel genético, los cuales alteran el nivel de compactación de la cromatina (denominados cambios epigenéticos), tales como metilaciones, oxidaciones u otro tipo de modificaciones bioquímicas, que permiten o reprimen la expresión de genes que se encuentran relacionados con la patogénesis de la EA, de manera que el ambiente en el que el paciente se desenvuelve tiene influencia sobre estos cambios epigenéticos que permanecen latentes en las células hasta que ocurre un “evento desencadenante” que puede estar relacionado con algún tipo de daño celular e induce a un proceso neuroinflamatorio, principalmente durante la vejez, produciendo alteraciones en la expresión genética, que culmina en el inicio del proceso neurodegenerativo característico de la enfermedad (Maloney y Lahiri, 2016).

2.4 Neuropatogénesis de la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

El proceso neurodegenerativo característico que produce la atrofia neuronal se encuentra asociado principalmente con las siguientes características histopatológicas: la formación de placas seniles neuríticas (PSN) extracelulares y ovillos neurofibrilares (ONF) intracelulares (Takashima y cols., 2019; Xekardaki y cols., 2015).

Los ovillos neurofibrilares están compuestos de la proteína tau en un estado hiperfosforilado. Esta proteína se une con alta afinidad a los componentes del citoesqueleto y su principal función es proporcionar estabilidad al mismo. Sin embargo, durante la progresión de la enfermedad esta proteína sufre modificaciones a nivel postraduccionales que la llevan a un estado de hiperfosforilación producido por la actividad de enzimas quinasas (principalmente GSK-3 β , CDK-5, PKC y PKA) en algunos de sus residuos serina-treonina, que

provoca la pérdida de afinidad a los microtúbulos, lo cual conduce a la desestabilización del citoesqueleto y promueve la formación de cúmulos de filamentos helicoidales enredados entre sí, que conforman los ovillos neurofibrilares (Chu y Liu. 2018; Gao y cols., 2018; Xekardaki y cols., 2015).

Por otra parte, las placas seniles neuríticas están conformadas por depósitos anormales de péptido β - amiloide (β A), formados por la escisión de la región C-terminal de la proteína precursora amiloide (APP) de 695-770 aminoácidos, que se encuentra codificada por el gen APP en el cromosoma 21; la escisión proteica puede ser generada a través de dos vías distintas: la vía constitutiva (no amiloidogénica), que produce fragmentos no neurotóxicos (sAPP α y fragmentos α C- terminales), mediante la acción de la enzima α y γ secretasa, que tienen una importante función en procesos de formación de nuevas espinas dendríticas (Mendiola y cols., 2016; Wang y Wang, 2016); y la vía amiloidogénica (Van Cauwenberghe y cols., 2016), en la que se producen péptidos β - amiloides (β A) de 39 – 43 aminoácidos de longitud, donde la fragmentación es catalizada por la enzima β -secretasa, una proteasa que se encuentra unida a la membrana celular; y la enzima γ -secretasa, la cual forma un complejo de membrana con su componente catalítico denominado presenilina. Existen dos isoformas conocidas del péptido β amiloideo (β A) producidas por la vía amiloidogénica; la isoforma soluble β A₄₀ y la insoluble β A₄₂. El péptido de 40 aminoácidos es el más abundante (aproximadamente constituye el 95 % del péptido β A extracelular, en contraparte solo el 5 % corresponde al péptido de 42 aminoácidos de longitud). Los hallazgos demuestran que el proceso de agregación del péptido β A, es producido por un incremento en los niveles de la isoforma insoluble β A₄₂, el cual es el componente nuclear de las placas seniles neuríticas, aunado a una disminución de la isoforma soluble β A₄₀ (Kundu y cols., 2020; Sun y cols., 2015; Xekardaki y cols., 2015).

La acumulación del péptido β A extracelular en tejido neuronal promueve el inicio de varios mecanismos que conducen a la muerte celular. Este incremento en los niveles de agregación de péptido β A induce una respuesta exacerbada de tipo

crónica por parte del sistema inmunológico, mediante la activación de las células de microglía y astrocitos, las cuales en respuesta, liberan altos niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α que a su vez generan un ciclo de retroalimentación positiva exacerbando el proceso neuroinflamatorio; por otro lado, se induce estrés oxidativo mediante el incremento de la liberación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y especies nítricas, las cuales reaccionan rápidamente con residuos de aminoácidos y lípidos, causando alteraciones estructurales y funcionales en los distintos organelos celulares, principalmente el daño en los componentes de la membrana plasmática, afectando la permeabilidad celular, daño mitocondrial, pérdida de función en enzimas esenciales y oxidación del ADN, culminando así en la muerte neuronal (**figura 1**) (Webers y cols., 2020; Sun y cols., 2015).

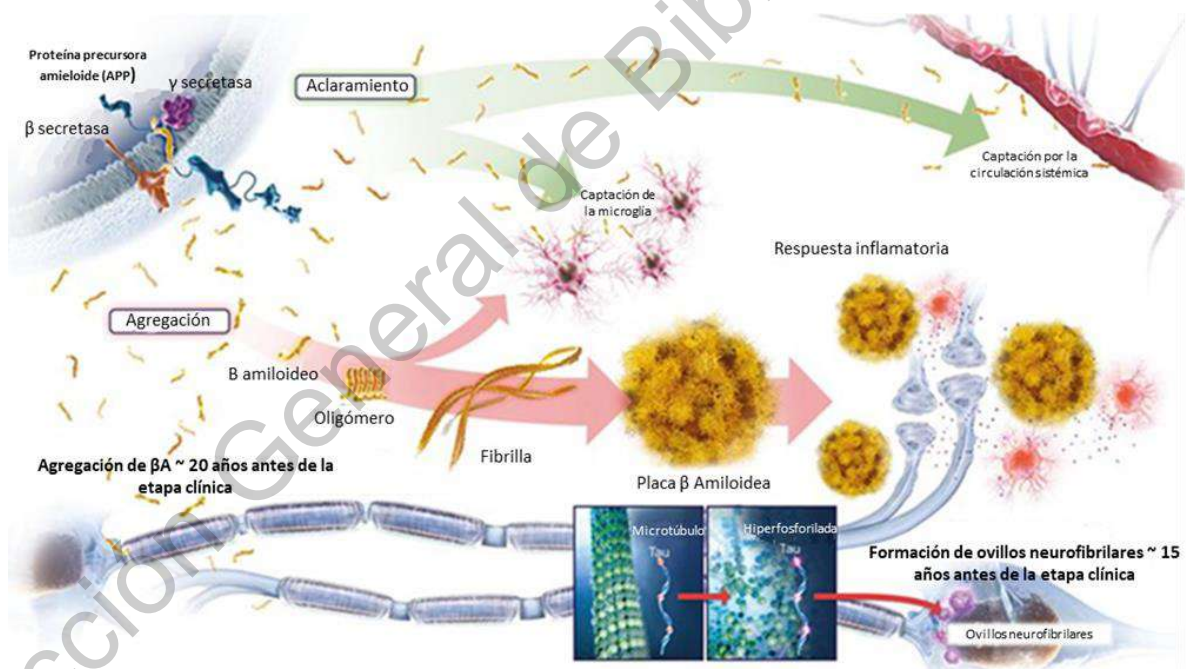


Figura 1. Patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, tomado de: Rubino y cols. (2018).

2.5 Factores genéticos relacionados a la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

La apolipoproteína E (APO E) es una glicoproteína de 299 aminoácidos, producida en el hígado, macrófagos y el sistema nervioso central, dentro del sistema nervioso central es secretada por células de la microglía y astrocitos. La APO E está involucrada en el metabolismo de los lípidos mediante el transporte de colesterol y triglicéridos a través del sistema linfático y circulatorio; dicho transporte está a su vez relacionado con procesos como el desarrollo neuronal, plasticidad neuronal, inmunoregulación, procesos de reparación y la activación de enzimas lipasas. En el *locus* APO E ubicado en el cromosoma 19 se han identificado 3 alelos, de los cuales los más frecuentemente encontrados en la población son los $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Las tres isoformas de las proteínas encontradas en el humano difieren únicamente en las posiciones 112 y 158 de aminoácidos, las variaciones observadas son: APOE2 (Cys 112 y Cys 158), APOE3 (Cys112 y Arg158) y APOE4 (Arg 112 y Arg 158). El alelo $\epsilon 4$ de la APO E4 está catalogado como el mayor riesgo genético para la EA esporádica, su frecuencia en la población es de aproximadamente el 15%, si bien, no todas las personas que presentan dicho alelo desarrollan la EA, si es considerado como un factor que contribuye en la progresión de los mecanismos debido a que los portadores tienen un riesgo 3 a 4 veces mayor de desarrollar la EA. Existen diversas propuestas que sugieren posibles mecanismos por los cuales el producto proteico, generado a partir del alelo $\epsilon 4$ (APOE4), participa en el desarrollo de la neuropatología de la EA, dado que la APO E participa en el proceso de aclaramiento de las fracciones solubles y depósitos del péptido βA a través de la barrera hematoencefálica, no obstante, el producto del alelo $\epsilon 4$ es el menos eficiente en dicha función, por lo tanto en presencia del producto del alelo $\epsilon 4$ existe un incremento de oligomerización del péptido βA , debido a un deficiente proceso de aclaramiento del péptido β -amiloide (βA), lo cual puede acelerar la agregación, disposición y acumulación de placas amiloides en el parénquima cerebral, además la presencia del alelo $\epsilon 4$ se encuentra relacionado con la disminución de la

neuroplasticidad tras una lesión cerebral, con la respuesta inflamatoria exacerbada y repercusión directa sobre el sistema cerebrovascular; de manera adicional, se ha descrito una posible interacción del dominio N-terminal de la APO E con la proteína Tau que contribuye a la formación de ovillos neurofibrilares, característicos de la EA (Zhao y cols. 2018; Yassine y cols., 2017; Van Cauwenberghe y cols., 2016).

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés Genome-Wide Association Studies) y el Proyecto Internacional de genómica de Alzheimer, han proporcionado datos, que contribuyen significativamente en la determinación de la etiología de origen genético de la enfermedad de Alzheimer tardía o esporádica, con la identificación de polimorfismos al alelo $\epsilon 4$ de la APO E, considerados como parte de los factores de riesgo para la EA (Takatori y cols., 2019).

Además, con la implementación de los métodos de la secuenciación de genoma completo y las tecnologías de microarreglos utilizadas en los análisis GWAS, se han identificado nuevos genes de riesgo para la EA, los cuales se han identificado y agrupado de acuerdo con las funciones que cumplen en los diversos mecanismos moleculares, implicados en el transporte de lípidos, inflamación y transporte vesicular del tejido neuronal. Se distinguen por su importancia: ABCA7 (por sus siglas en inglés ATP-binding cassette subfamily A member 7), es una proteína de unión a ATP altamente expresada en la región del hipocampo y que participa en los procesos de metabolismo de lípidos y respuesta inmune; TREM 2, es una proteína expresada en la microglía que participa en la fagocitosis, diferenciación y proliferación glial y se encuentra relacionada con el aclaramiento βA , patología tau y neurotoxicidad. Los polimorfismos identificados de TREM 2 representan un riesgo comparable al de la APO E; CLU (clusterina), que constituye proteína chaperona que participa en el transporte de lípidos, respuesta inmunológica y el aclaramiento del péptido β amiloide; CR1 y CD33 son proteínas que se encuentran relacionadas con la respuesta inmune e inflamación; BIN1, EPHA1 y SORL1, son productos de

genes involucrados con el transporte vesicular mediado por clatrina y el reciclaje de vesículas post- sinapsis (Takatori y cols., 2019).

2.6 Factores genéticos asociados a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano

La etiología que determina la EA de inicio temprano o familiar es de origen genético. Como se mencionó con anterioridad los principales genes identificados son: APP, PSEN 1 y PSEN 2. En el gen que codifica para la APP se han identificado un total de 39 mutaciones, favoreciendo un incremento en la producción del $A\beta_{42}$ tras la escisión proteolítica por la vía amiloidogénica, los productos generados suelen ser proteínas truncas en los extremos N y C- terminales. Por otro lado, los genes PSEN 1 y PSEN 2 presentan alta homología, y sus productos Presenilina 1 y Presenilina 2 respectivamente, forman parte importante del complejo catalítico de la enzima y secretasa, que participa en la cascada amiloidea. Las mutaciones ocurridas en el gen PSEN1, están relacionadas con la forma de inicio más veloz y agresiva, reportada en EA de inicio temprano, debido a que los individuos que la padecen pueden presentar complicaciones desde edades tempranas (incluso en menores de 25 años). Las mutaciones presentadas en el gen PSEN2, suelen relacionarse con formas de la enfermedad menos severas y se pueden presentar en un rango de edades mayores (39 - 83 años) que la enfermedad causada por las mutaciones de PSEN1 (Bertram y Tanzi, 2019; Van Cauwenberghe y cols., 2016).

2.7 Tipos de memoria y zonas cerebrales implicadas

La memoria es la capacidad para almacenar información y experiencias adquiridas del entorno, que puede ser nuevamente recordada mediante el disparo sincrónico de un determinado patrón de conexiones neuronales (Dickerson y Eichenbaum, 2009; Sherwood, 2016). Las memorias se pueden clasificar en: memoria de corto plazo (retención de segundos u horas) y memoria de largo plazo (retención de días o años). La memoria a corto plazo puede transformarse en una memoria a largo plazo; para ello debe atravesar por un proceso que se conoce como consolidación

(Squire y Zola-Morgan, 2015), el cual ocurre a través de la potenciación a largo plazo al consolidarse las conexiones sinápticas por medio de la síntesis *de novo* de proteínas, el incremento en la producción y liberación de neurotransmisores y sensibilidad en los receptores para dar una respuesta más veloz (Lazarov y Hollands, 2016); un tipo conocido de memoria a corto plazo es la memoria de trabajo, la cual consiste en la retención de información necesaria para llevar a cabo diversas tareas cognitivas. Por otro lado, la memoria también puede ser clasificada en memoria declarativa (explícita), es decir el tipo de memoria a la cuál tenemos acceso de forma consciente como recuerdos. Otro tipo de memoria es la memoria no declarativa o implícita, la cual es inconsciente e incluye hábitos, habilidades, sistema de recompensa y formas simples de condicionamiento (Squire y Zola, 1996). A su vez, la memoria declarativa puede subdividirse en memoria semántica y memoria episódica. La memoria semántica implica la retención del conocimiento factual, sin considerar el tiempo y el lugar, como las características físicas de los objetos y la información contenida en un libro. La memoria episódica por otro lado es la capacidad de recordar información de eventos específicos tomando en cuenta detalles como tiempo y ubicación (Dickerson y Eichenbaum, 2009).

Otro tipo de memoria declarativa es la memoria espacial, que permite recordar lugares anteriormente visitados, orientarse en un determinado plano y realizar tareas de orientación espacial y reconocimiento de lugares, a su vez esta memoria engloba la memoria de referencia que es un tipo de memoria a largo plazo (Broadbent y cols., 2004).

Clasificación de la memoria

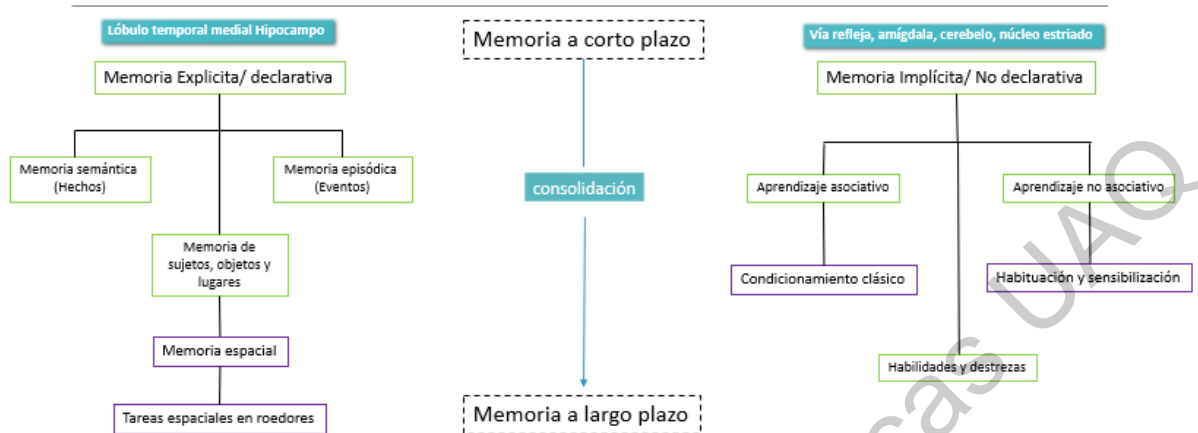


Figura 2. Clasificación de la memoria humana, *modificado de* Squire y Dede, (2015). La figura muestra los distintos tipos de memoria humana y sus estructuras cerebrales relacionadas.

Para cada tipo de memoria están involucradas diferentes regiones cerebrales, particularmente regiones de la corteza prefrontal en humanos (frontal en animales), hipocampo y cerebelo. En el caso de la memoria de trabajo la principal estructura relacionada es la corteza prefrontal, que permite el almacenamiento temporal para tener la información relevante a la mano y poder ejecutar tareas como la planificación, juicios, resolución de problemas y toma de decisiones (Sherwood, 2016). Por otro lado, en la memoria declarativa a largo plazo se encuentran asociadas estructuras del lóbulo temporal medial como el hipocampo y estructuras del giro parahipocampal adyacente, como la corteza entorrinal, perirrhinal y las cortezas parahipocampales, para la codificación de objetos, escenas y sus asociaciones (Squire y Dede, 2015). Una lesión a nivel del lóbulo temporal medial puede provocar la pérdida de memoria a largo plazo. En cuanto a la memoria no declarativa (implícita) participan estructuras como el núcleo estriado (habilidades y hábitos), neocorteza (sistema de recompensa), en condicionamiento simple: la amígdala (respuestas emocionales) y el cerebelo (respuestas musculares esqueléticas) y el aprendizaje no asociativo ocurre por medio de las vías reflejas (Squire y Zola, 1996).

2.8 Fases clínicas de la Enfermedad de Alzheimer

Desde las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer puede identificarse por las alteraciones cerebrales metabólicas y estructurales por medio de marcadores bioquímicos como los niveles del péptido β amiloide en líquido cefalorraquídeo (LCR) o mediante escaneos por tomografía de emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés), a la EA progresiva de la se le denomina como Enfermedad de Alzheimer continua, que involucra 3 etapas sucesivas: la Enfermedad de Alzheimer pre-clínica, deterioro cognitivo leve debido a la Enfermedad de Alzheimer y demencia por la Enfermedad de Alzheimer. A su vez la fase de demencia, la Enfermedad de Alzheimer se subdivide en tres etapas: leve, moderada y severa. La duración de cada fase puede variar dependiendo de distintos factores como la edad, sexo, genética y otros factores que involucran el estilo de vida del paciente (Jack y cols., 2018; Alzheimer's Assosiation 2020).

2.9 Los síntomas de la demencia en la Enfermedad de Alzheimer

La demencia que se presenta en EA se considera como un síndrome, debido a que agrupa ciertos síntomas específicos, los cuales son provocados por los procesos neurodegenerativos. La gravedad de los síntomas varía dependiendo de la etapa en la que el paciente se encuentre. La primera fase preclínica de la Enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la ausencia de síntomas cognitivos; sin embargo, durante esta fase es cuando comienzan las alteraciones bioquímicas características de la enfermedad; la siguiente fase de deterioro cognitivo leve está determinada por la presencia de síntomas leves que generalmente son detectados por los familiares de los pacientes, no obstante continúan con la capacidad de realizar sus actividades cotidianas; finalmente durante la fase de demencia por la Enfermedad de Alzheimer, los síntomas son más notorios como la pérdida progresiva de la memoria, dificultades relacionadas con el lenguaje y resolución de problemas, en la etapa de demencia leve los pacientes requieren asistencia solo para llevar a cabo algunas actividades, pero aún se consideran personas independientes; durante la etapa de

demencia moderada la disminución de las capacidades cognitivas imposibilitan a los pacientes para llevar a cabo sus tareas cotidianas, además presentan síntomas conductuales; durante la última fase de demencia severa, los pacientes permanecen completamente incapacitados y requieren de cuidados diarios, durante esta fase algunas de las complicaciones que presentan son ulceraciones, sepsis o trombosis debido a la inmovilidad por permanecer largos periodos en cama, así como pérdida de la capacidad de deglución con lo que conduce a la necesidad de la inserción de sondas de alimentación, por lo tanto se incrementa el riesgo de neumonía por aspiración, siendo esta la causa más común de muerte en pacientes con la EA. Algunos de los síntomas más representativos incluyen:

- Pérdida de memoria a corto plazo, en sus actividades cotidianas, en donde el paciente requiere del apoyo de agendas o recordatorios electrónicos.
- Dificultad en la resolución de problemas y pérdida de concentración; los pacientes presentan dificultad para llevar a cabo una planeación y concluir tareas diarias que forman parte de su rutina.
- Pérdida de juicio y desorientación. Los pacientes pueden presenciar dificultad en su capacidad de toma de decisiones y pierden interés por su cuidado personal.
- Pérdida de noción del tiempo y localización.
- Presentan problemas visuales como la percepción de colores y contrastes, así como de orientación espacial.
- Existe deterioro en el lenguaje oral y escrito, con lo cual los pacientes tienen dificultades para comunicarse de manera habitual.
- Aislamiento del entorno social.
- Alteraciones de ánimo y personalidad de forma constante; pueden tener sensación de confusión, ansiedad, temor, angustia e incluso depresión al ser conscientes de su estado.

A lo largo de las etapas de la Enfermedad de Alzheimer continua, los pacientes pueden experimentar gran cantidad de síntomas que pueden variar e intensificarse.

También, la intensidad de estos síntomas es reflejo del grado de deterioro neuronal presentado en el paciente; sin embargo, pueden variar entre individuos, ya que en unos casos pueden ser leves a moderados y en otros cursan con mayor severidad (Alzheimer's Association, 2018; Alzheimer's Association, 2020).

2.10 Criterios de diagnóstico para la Enfermedad de Alzheimer

Para establecer el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer, existen diversos criterios establecidos por instituciones y asociaciones nacionales e internacionales como el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de la Enfermedad de Alzheimer (NIA-AA) (Jack y cols. 2018).

Entre los criterios establecidos para la detección de la enfermedad de Alzheimer en su fase preclínica, se incluyen evaluaciones psiquiátricas y psicológicas en conjunto con estudios de neuroimagen, para la detección de la acumulación de péptido β amiloide, a través de tomografía por emisión de positrones, imagen por resonancia magnética MRI (Magnetic Resonance Imaging) y el uso de biomarcadores, como la detección de la concentración de los niveles de βA_{42} , detección de citocinas pro-inflamatorias y productos del estrés oxidativo, presentes en el plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Jack y cols., 2018; Dubois y cols., 2016). La detección del péptido βA mediante escaneo PET es un estudio de gran ayuda, que posee alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico, desde la fase prodrómica de la enfermedad, debido a que proporciona información útil para conocer el desarrollo del proceso neurodegenerativo, mediante el empleo de compuestos especializados que atraviesan la barrera hematoencefálica y poseen una alta afinidad de unión a los oligómeros βA . El primer compuesto desarrollado en 2002 fue llamado el compuesto de Pittsburgh B (PiB), el cual contiene el isótopo del carbono 11 radiactivo, y funciona como una sonda análoga del colorante amiloide fluorescente tioflavina-T62, que posee una vida media corta de 20 minutos; a partir de este compuesto se derivaron otros marcados con F18, los cuales poseen una vida media más larga (Marcus y cols., 2014), el diagnóstico puede ser complementado

obteniendo el escaneo PET con fluorodeoxiglucosa (FDG), con la finalidad de determinar el nivel de disminución en el metabolismo de la glucosa del encéfalo enfermo, en comparación con la actividad metabólica de un encéfalo sano (Alzheimer's Association, 2018). Además, se utiliza el llamado "perfil de la enfermedad de Alzheimer en líquido cefalorraquídeo" (LCR), que incluye la cuantificación de los niveles de T- Tau (proteína Tau total), P- Tau (proteína Tau fosforilada), y péptido βA_{42} (Forlenza y cols., 2015).

La acumulación del péptido βA en el escaneo PET junto con bajos niveles de péptido βA en líquido cefalorraquídeo, pueden ser detectables desde 15 años antes de la pérdida cognitiva y la degeneración neuronal característica de la EA.

El perfil de líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Alzheimer arroja un resultado positivo, si los valores de la concentración de βA_{42} se encuentran disminuidos y los valores de P- Tau y T- Tau se encuentran aumentados, este perfil posee alta sensibilidad (de 85 a 90 %) para el diagnóstico de la EA. Además, constituye una herramienta de apoyo, para el diagnóstico diferencial para otras enfermedades neurodegenerativas y es utilizado para evaluar la efectividad del tratamiento farmacológico experimental.

La presencia del péptido βA en el PET y la detección de los niveles de βA_{42} en LCR, proporcionan la información necesaria del nivel de acumulación del péptido βA para establecer un diagnóstico desde fases tempranas: como la preclínica y el deterioro cognitivo leve por la Enfermedad de Alzheimer, mientras que la detección de los niveles de T- Tau y P- Tau, expresan la magnitud del proceso neurodegenerativo, en las distintas etapas de la fase de demencia de la enfermedad. Los marcadores del LCR durante la etapa de demencia presentan marcadas alteraciones: los niveles de péptido βA se pueden encontrar disminuidos hasta en un 50% comparado con niveles normales, mientras que los niveles de T- Tau y P- Tau se encuentran incrementados aproximadamente en un 300% y 200 % respectivamente; todos estos parámetros en conjunto hacen el diagnóstico con una certeza entre 85%-95%.

Además, la progresión de la EA se puede evaluar con la medición de los parámetros de P-Tau en LCR y tau-PET con el trazador [18F] flourotaucipir que se une a los filamentos helicoidales, así ambos parámetros dan información del estado de hiperfosforilación asociada estrechamente con el deterioro cognitivo de los pacientes (Wolters y cols., 2020).

El diagnóstico definitivo de la EA puede obtenerse con base en el estudio histopatológico *post-mortem* del tejido encefálico. Así, durante la vida del paciente el diagnóstico solo es “probable” ya que está basado solo en el conjunto de resultados obtenidos a partir de las evaluaciones clínicas individuales, test neuropsicológicos, pruebas de laboratorio, resultados de exploración física y de neuroimagen (Jack y cols., 2018; Alzheimer’s Association, 2020).

2.11 Criterios de prevención para la Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

Debido a que la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío se considera de etiología multifactorial, es necesario implementar medidas de prevención en cada uno de los factores, relacionados con el estilo de vida de una persona con riesgo a padecer la enfermedad, pues la mayoría de los riesgos son potencialmente modificables y están involucrados con el estilo de vida de los individuos; tales como inactividad física, hipertensión, obesidad, diabetes, hipercolesterolemia, hábito de fumar y bajo nivel educativo. Se ha reportado el efecto neuroprotector de nutrientes incluidos en alimentos, tales como ácidos grasos poliinsaturados omega 3, y vitaminas como el complejo B y la vitamina D, antioxidantes, la cuales se encuentran presentes en alimentos como frutas, verduras, pescado y nueces. A partir de éstos conocimientos se han diseñado dietas, recomendadas para pacientes con riesgo de EA, tales como la dieta Mediterránea y DASH (por sus siglas en inglés: (Dietary Approaches to Stop Hypertension); además se ha sugerido que la dieta sea complementada con actividad física moderada, con el objeto de reducir de manera significativa el riesgo de padecer enfermedades metabólicas; así mismo, es de gran importancia contar con entrenamientos específicos que ayuden a mejorar las funciones cognitivas,

como la rapidez de razonamiento y procesamiento de la información sensorial (Kivipelto y cols., 2018). Gracias a las distintas técnicas de diagnóstico basadas en neuroimagen y biomarcadores, la detección de la enfermedad puede obtenerse desde fases asintomáticas, lo cual permite a los pacientes tomar distintas medidas de prevención, para evitar la progresión de la enfermedad y frenar el proceso neurodegenerativo, por lo tanto, además de seguir las recomendaciones preventivas no farmacológicas, es imprescindible complementar con tratamiento farmacológico.

Existen diversos métodos de prevención, que han sido recientemente descubiertos y algunos más que se encuentran fase de estudio. Actualmente las estrategias terapéuticas se dirigen a mejorar los procesos de aclaramiento a través de la barrera hematoencefálica y la administración de compuestos neuroprotectores; se pretende que estas terapias sean dirigidas a personas de aproximadamente 50 años en adelante, previo al inicio del proceso neurodegenerativo (Sharma y cols., 2019; Yan y cols., 2019; Masters y cols., 2015).

2.12 Tratamiento para la enfermedad de Alzheimer

Actualmente existen cuatro medicamentos aprobados como tratamiento de la enfermedad de Alzheimer por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos en Estados Unidos): rivastigmina, galantamina, donepezilo y memantina; sin embargo, ninguno de estos medicamentos es capaz de revertir el daño y la atrofia neuronal producida durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Algunos de estos fármacos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, incrementando la presencia de acetilcolina, la cual se ve afectada debido a la acumulación progresiva del péptido β A. Por su parte, la memantina, es un antagonista no competitivo del receptor N-Metil-D-aspartato (NMDA) que evita el daño por excitotoxicidad producido por incremento del influjo de Ca^{+2} producido a su vez por el incremento anormal de los niveles del neurotransmisor excitatorio glutamato en la hendidura sináptica, evitando así la activación de los procesos que conducen a la

neurodegeneración y mejorando el estado cognitivo (Alzheimer's Association, 2020; Cao y cols., 2020).

Se han desarrollado nuevos tratamientos inhibidores de las enzimas que participan en la vía amiloidogénica como las gamma y beta secretasas, algunos otros enfocados en los sistemas de eliminación del péptido β A como la actividad de enzimas degradadoras como la Neprilisina o inmunoterapia para disminuir la carga amiloide; actualmente se encuentra en curso un posible tratamiento basado en inmunoterapia activa que se llevó a cabo desde 2019, en el cual se combinó CAD106 que son copias del epítipo derivado del péptido β A₁₋₆ y CNP520 (umibecestat) que es un inhibidor de la beta secretasa 1, en sujetos sin deterioro cognitivo pero que eran portadores del alelo ApoE4; hasta el momento cesaron los ensayos para CNP520 debido a que los resultados no fueron favorables, sin embargo aún continúan los ensayos para CAD106. En 2019 se realizaron los ensayos farmacológicos de inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti- β A: aducanumab, crenezumab, gantenerumab, solanezumab y la combinación de los dos últimos. Hasta el momento el anticuerpo aducanumab que está dirigido a los agregados β A redujo la carga amiloide y continúa en evaluación en bajas dosis. Igualmente, los anticuerpos gantenerumab y crenezumab dirigidos a agregados β A los cuales han demostrado ser seguros en dosis altas y continúan en ensayos para evaluar su efectividad y seguridad, no obstante, el anticuerpo solanezumab que está dirigido a la región N- terminal y central del péptido β A no mostró eficacia en los ensayos de fase 3. Otros fármacos que continúan en evaluación son E2609 (elenbecetat) inhibidor de BACE-1 el cual se encuentra en fase 2 y GV-971(oligomanurato de sodio) que puede unirse al péptido β A y evitar la agregación, este fármaco mostró en los ensayos de fase 3 una mejora del estado cognitivo en pacientes con EA leve a moderada además disminuyó el proceso neuroinflamatorio y restauró la microbiota intestinal. También se han desarrollado nuevas terapias dirigidas a receptores de los sistemas de neurotransmisores, inmunoterapia anti-

tau, anti- neuroinflamatorios y neuroprotectores como terapia complementaria (Huang y cols., 2020).

Además del tratamiento farmacológico, éstos se han complementado con terapias no farmacológicas, las cuales constituyen un conjunto de estrategias utilizadas para disminuir el riesgo a padecer la EA, o los síntomas presentados durante la enfermedad, mejorando así las habilidades cognitivas.

Dentro de las especificaciones recomendadas en los pacientes con riesgo a padecer EA se incluyen cambios en el estilo de vida, tales como dietas específicas, con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados como el omega 3, ya que existe una correlación significativa entre el manejo de una dieta de bajo consumo de omega 3 y el riesgo de padecer la EA, una dieta alta en omega 3, puede reducir significativamente la inflamación en el tejido neuronal y mejorar la plasticidad sináptica en la EA, así como el consumo de la vitamina D, complejo B, polifenoles como el resveratrol, β - caroteno, licopeno y luteína que han sido reportados como agentes antioxidantes y antiinflamatorios, los cuales contribuyen a la prevención del daño causado por el estrés oxidativo. Estos componentes se encuentran presentes en vegetales, frutas, legumbres, aceite de oliva, pescado y vino (Kivipelto y cols., 2018; Solfrizzi y cols., 2017); otro factor favorable para tratar con los padecimientos ocasionados por la EA es la actividad física moderada, que incrementa el flujo sanguíneo y el aporte de glucosa a nivel cerebral, debido a que promueve el incremento en la liberación del factor neurotrófico BDNF, el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF- 1), factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que estimulan la neurogénesis y plasticidad sináptica, además contribuye a la disminución de radicales libres, evitando el incremento del proceso inflamatorio; existen también, entrenamientos diseñados para mejorar las funciones cognitivas, como el razonamiento y procesamiento de información. Otro proceso importante es la socialización del paciente, ya que contribuye de manera significativa al desarrollo mental y físico durante la EA para reducir padecimientos como depresión, consumo excesivo del alcohol, obesidad e

hipertensión que pueden ser factores agravantes del padecimiento (Mendiola-Precoma y cols., 2016); sin embargo, cabe destacar que al igual que los tratamientos farmacológicos estos procesos no son capaces de detener la progresión de la enfermedad ni restauran el daño neuronal.

2.13 Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral (OBX)

Para el estudio de la EA existen una gran cantidad de modelos *in vivo*, entre los cuales están los modelos que han sido modificados mediante ingeniería genética, basados en la mutación de alguna proteína específica de importancia, modelos por inyección de sustancias neurotóxicas, modelo de senescencia acelerada, entre otros. A la fecha se sabe que ninguno de los modelos en animales utilizados en estudios de la EA, puede reproducir de manera fiel los signos cognitivos, conductuales, así como las alteraciones bioquímicas y patológicas de la EA. En especial si se trata de la forma de EA esporádica, debido a los múltiples factores de riesgo que la desencadenan; no obstante, existen algunos modelos murinos, que se acercan en mayor medida a las alteraciones patológicas que caracterizan la EA, principalmente la formación de placas amiloideas y ovillos neurofibrilares, tal es el caso del modelo de bulbectomía olfatoria bilateral, que es el modelo seleccionado para el presente estudio (Gulyaeva y cols., 2017).

El sistema olfativo, tiene como función percibir los olores del medio ambiente, siendo el sentido del olfato uno de los más importantes en los mamíferos; además, se ha demostrado que el sistema olfatorio, posee un importante papel en funciones cognitivas, tales como la memoria y el aprendizaje. La función olfativa puede disminuir debido a los cambios fisiológicos normales en el envejecimiento; sin embargo, también se ha observado una disfunción olfatoria en enfermedades neurodegenerativas. Existen diversos estudios que demuestran las alteraciones estructurales y funcionales en pacientes con EA en distintas zonas cerebrales, como el epitelio olfatorio, el bulbo olfatorio, la corteza entorrinal y el hipocampo, la disfunción olfatoria se presenta durante las primeras etapas de la EA. La

disminución de la función olfatoria, es un hallazgo de un menor volumen del hipocampo, demostrado mediante imágenes de resonancia magnética en pacientes con EA (Rey y cols., 2018; Franks y cols., 2015; Hu y cols., 2012).

El sistema olfativo se encuentra conformado por varias estructuras neuronales, entre ellas se encuentran los bulbos olfatorios (OB) ubicados en la base del lóbulo frontal, cuyos axones se proyectan hacia estructuras de orden superior, como: el núcleo olfativo anterior (NOA), la corteza piriforme (CXP), el núcleo cortical anterior de la amígdala, la corteza periamigdalóide, y la corteza entorrinal rostral; las cuáles a su vez tienen conexiones con zonas cerebrales que se muestran afectadas en la EA, tales como el hipocampo (Avetisyan y cols., 2016; Franks y cols., 2015). Es por esta razón que se define como una red de núcleos de neuronas, en las que participan neuronas aferentes y eferentes que se proyectan desde los bulbos olfatorios, hasta las estructuras de orden superior (Gulyaeva y cols., 2017), cuyas conexiones se cree que pueden estar implicadas en la progresión del mecanismo neurodegenerativo, hacia las regiones de la corteza entorrinal, el hipocampo, la corteza temporal. Diversos hallazgos demuestran la presencia de ovillos neurofibrilares en los bulbos olfatorios y el tracto olfativo, durante las primeras etapas de la EA (Rey y cols., 2018; Avetisyan y cols., 2016; Franks y cols., 2015).

La bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) en modelos murinos, consiste en la eliminación bilateral de los bulbos olfatorios; este proceso desencadena cambios morfológicos, bioquímicos e inmunológicos característicos de la EA, tales como, atrofia producida por la muerte neuronal en distintas zonas cerebrales, en especial en la corteza e hipocampo acompañada con una marcada disminución de la actividad de los sistemas colinérgicos y serotoninérgicos (Gulyaeva y cols., 2017); además del desarrollo de alteraciones conductuales como hiperactividad, depresión, incremento de la agresividad, y síntomas tales como ingesta reducida de alimentos, la pérdida de memoria espacial, hipertermia e hiperhomocisteinemia (Morales-Medina y cols., 2017). En diversos estudios *post mortem* de animales bulbectomizados se ha demostrado un incremento de los niveles cerebrales del

péptido beta amiloide (β A) e hiperfosforilación de la proteína Tau (Li y cols., 2016), siendo estas, las dos principales características patológicas de la EA; además de un importante déficit energético consecuencia del daño mitocondrial generado después del procedimiento quirúrgico. Diversos estudios han mostrado que después de 5 semanas post bulbectomía bilateral olfatoria, aparecen los cambios bioquímicos y conductuales característicos de la EA (Avetisyan y cols., 2016; Franks y cols., 2015; Hu y cols., 2012). La aparición de estos cambios típicos de la EA, en un periodo relativamente corto de tiempo, constituye una ventaja del modelo (Gulyaeva y cols., 2017); además, se ha demostrado que la administración de donepezilo y memantina (medicamentos que forman parte del tratamiento farmacológico para la EA) a los animales bulbectomizados (OBX) tienen un efecto terapéutico favorable (Morales-Medina y cols., 2017).

El procedimiento de bulbectomía produce una serie de alteraciones neurodegenerativas acompañadas de un incremento en la síntesis de APP, lo cual produce un aumento de péptido β amiloideo y su posterior acumulación en forma de placas compactas extracelulares (Gulyaeva y cols., 2017). Diversos estudios han mostrado que las neuronas receptoras olfativas (ORN) del sistema olfatorio, se ven afectadas por la creciente acumulación del péptido β A con la pérdida de la actividad neuronal normal (Franks y cols., 2015).

La disminución del metabolismo energético en animales OBX, es producido por una alteración estructural y pérdida en la función mitocondrial neuronal. Se han demostrado alteraciones graves en el funcionamiento de las mitocondrias aisladas del neocórtex y el hipocampo en ratones bulbectomizados, con una baja tasa de oxidación de NADH, un potencial transmembranal reducido y una disminución de la citocromo c oxidasa (complejo IV), el incremento en los marcadores de estrés oxidativo tales como: las especies reactivas del oxígeno (EROs) y la acumulación de productos de peroxidación lipídica en mitocondrias, mecanismos que se han relacionado con altos niveles de péptido β A y muerte neuronal. Por lo tanto, los

animales OBX pueden representar un modelo de EA válido, para estudiar los mecanismos de neurodegeneración (Gulyaeva y cols., 2017; Franks y cols., 2015).

Otros efectos de la OBX son las alteraciones funcionales que ocurren en los sistemas de neurotransmisores colinérgico, serotoninérgico y noradrenérgico cerebrales. Las estructuras cerebrales que se encuentran principalmente afectadas en la EA, son núcleos neuronales que participan en la regulación y actividad de los principales neurotransmisores, como la acetilcolina, la serotonina, la dopamina y la noradrenalina (Gulyaeva y cols., 2017).

2.14 Efectos de los ácidos grasos en la disfunción cognitiva de la Enfermedad de Alzheimer en ratas bulbectomizadas.

El sistema nervioso central (SNC) está constituido en un gran porcentaje, por ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), los cuales participan en funciones esenciales tales como la plasticidad cerebral, supervivencia celular y la regulación de la respuesta inmunológica (Laye y cols., 2018); los principales AGPI Ω -3 y Ω -6 que se encuentran presentes en el SNC son el Ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6, Ω -3) y ácido araquidónico (AA, 20: 4, Ω -6) que se producen enzimáticamente en el hígado por enzimas desaturasas (Rey y cols., 2018).

El DHA es el AGPI-CL más abundante en el SNC (representa más del 40% de los AGPI Ω -3), posee seis dobles enlaces en su estructura, es sintetizado a partir de un ácido graso precursor conocido como: ácido α linolénico (ALA) y es un componente clave de las membranas fosfolipídicas en las neuronas y las sinapsis, tiene una función específica en la disminución del estrés oxidativo, neuroinflamación, supervivencia celular, participa en la transducción de señales en neuronas y regulación de la transcripción de proteínas, así como en la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial, lo cual se ha correlacionado con un menor riesgo de accidente cerebrovascular isquémico (Lacombe y cols., 2018; Solfrizzi y cols., 2017). Además de la producción endógena, los niveles de DHA en la circulación pueden incrementarse por el consumo directo a través de los alimentos (Laye y

cols., 2018). Se ha demostrado que la suplementación de la dieta con DHA a animales y humanos con EA, mejora significativamente las funciones cognitivas relacionadas con el aprendizaje, memoria, sueño, umbral del dolor y termorregulación (Yehuda, 2012; Berger y cols., 2017), debido a que el DHA estimula la expresión de genes que regulan una variedad de funciones biológicas importantes para la salud cognitiva, incluida la neurogénesis y función neuronal. Además, otros estudios han mostrado que el efecto de la suplementación con DHA en la dieta de ratones transgénicos disminuye los depósitos del péptido beta-amiloide (β A) (Rey y cols. 2018; Solfrizzi y cols. 2017). Todos estos datos apuntan a que la dieta puede constituir uno de los factores modificables que pueden ser aprovechados, para disminuir el riesgo de padecer desequilibrios metabólicos que conducen a la EA (Rey y cols., 2018; Fernando y cols., 2015).

El SNC se encuentra conformado en gran parte por ácidos grasos poliinsaturados, esta condición lo hace susceptible a sufrir daño producido por estrés oxidativo, el cual es atribuido a la alta tasa metabólica neuronal, la cual conlleva a una elevada producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). En pacientes con EA, el proceso de agregación del péptido β A, provoca el incremento de producción de EROs, las cuales pueden provocar daño en las membranas lipídicas mediante una reacción auto-catalítica en cadena no enzimática, conocida como peroxidación lipídica; dicha reacción comienza con una reacción simple, para luego progresar a una reacción en cadena que produce un extenso daño oxidativo de los lípidos en las membranas celulares y la formación de productos neurotóxicos (**figura 2**); dichos productos pueden alterar de manera irreversible varias proteínas en el tejido neuronal, se pierde la función de las ATPasas iónicas y los transportadores de glutamato y glucosa; por lo tanto, estas alteraciones oxidativas se acumulan durante el envejecimiento y se amplifican en zonas cerebrales vulnerables, produciendo disfunción sináptica y degeneración neuronal en pacientes con EA.

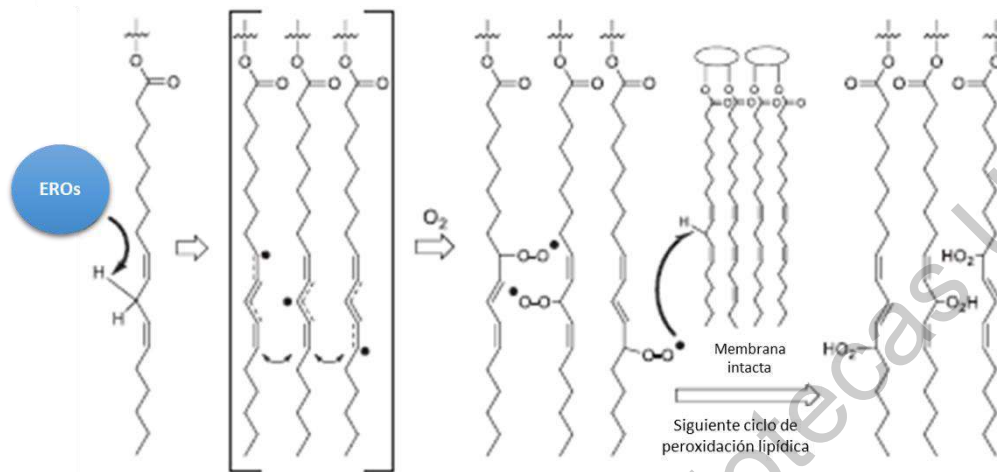


Figura 3. Proceso de peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados. La oxidación de los dobles enlaces en los ácidos grasos genera radicales libres estabilizados por resonancia que rápidamente reaccionan con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo lipídicos, formándose nuevas especies reactivas que oxidan a más dobles enlaces, convirtiéndose en una reacción en cadena de peroxidación lipídica. Modificado de Raefsky y cols (2018).

Además, se ha demostrado que el proceso de peroxidación lipídica provoca una alteración oxidativa, en proteínas específicas del complejo enzimático de la y secretasa, alterando así el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP), resultando en un incremento de la concentración del péptido βA_{42} , incrementando a su vez el proceso neuroinflamatorio (Raefsky y cols., 2018). Todo esto resalta la importancia de la suplementación en la dieta de los ácidos grasos poliinsaturados. Los niveles adecuados de ácidos grasos omega 3 mantienen la integridad y funcionalidad neuronal, específicamente de DHA, ya que existen datos que han mostrado que la disminución en los niveles de DHA en el sistema nervioso central, provoca el aumento de daño oxidativo y la pérdida de estructuras que componen a las neuronas y sinapsis (Gaurav y Watson, 2014).

Es importante destacar que la regulación de que ejercen los AGPI-CL sobre la actividad antiinflamatoria es producida a través de mediadores lipídicos, conocidos como oxilipinas, los cuales derivan específicamente del ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido araquidónico (AA); algunas de las oxilipinas conocidas son: eicosanoides, resolvinas, protectinas y maresinas, de las cuales las derivadas del DHA y EPA ejercen actividad antiinflamatoria. En presencia de una lesión o de isquemia, se genera un proceso neuroinflamatorio que incrementa los niveles de expresión de enzimas tales como, ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y el citocromo P450 (CYP) que catalizan la síntesis de oxilipinas, las cuales, pueden promover la actividad antiinflamatoria mediante la regulación positiva del antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL1RN), la proteína integrina B 2 (ITGB2) y la expresión de NF- κ B lo que a su vez estimula la regulación negativa de la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 e IL-6. En contraparte, se ha sugerido también que una dieta rica en n-6 AGPI-CL como el ácido araquidónico (AA) puede generar oxilipinas proinflamatorias como prostaglandinas (PG), tromboxanos (Tx), leucotrienos (LT) y ácidos hidroxiocetadecadienoicos (HODE); de tal forma que la evidencia señala que al incrementar el consumo DHA favorece el incremento de sus derivados con efecto anti-inflamatorio de tal forma que contrarrestan el efecto pro-inflamatorio de los derivados del ácido araquidónico en el SNC. Rey y colaboradores en 2018, encontraron que tras la administración de una dieta suplementada en Ω -3 AGPI-CL en modelos *in vivo*, se presentó una reducción significativa de los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF α en la zona cerebral del hipocampo, así mismo se demostró un incremento en los niveles de oxilipinas, lo que finalmente produjo una disminución de la inflamación hipocámpal (Rey y cols., 2018; Heras- Sandoval y cols., 2016).

Así mismo, el DHA también está relacionado con la reducción en la expresión de la proteína pro-apoptótica: p53; inhibiendo el proceso de apoptosis; las oxilipinas producidas enzimáticamente a partir del DHA como la resolvina D1, a través de la unión con el receptor de quimiocina 32 acoplado a proteína G y a través de la vía

de señalización PI3 quinasa y Akt, inhibe a proteínas pro- apoptóticas de la vía intrínseca como Bad, evitando así el proceso de apoptosis (Rey y cols. 2018; Heras-Sandoval y cols., 2016; Gaurav y Watson, 2014).

El efecto de la suplementación de DHA en el modelo de EA de bulbectomía olfatoria bilateral, fue estudiado anteriormente por Pudell y colaboradores en 2014, quienes encontraron que el consumo de aceite de pescado (con alto contenido de DHA) durante los periodos prenatal y postnatal en ratas bulbectomizadas (OBX), puede prevenir y mejorar el estado cognitivo similar a depresión y ansiedad, así como mantener los niveles de serotonina normales, tras el proceso degenerativo presentado en zonas límbicas cerebrales, que provocan una disfunción de los sistemas noradrenérgicos y serotoninérgicos a causa de la OBX; así mismo se encontró que la deficiencia en la dieta del AGPI omega 3, puede conducir a una reducción en la síntesis central de serotonina, por lo tanto los efectos de la suplementación de aceite de pescado durante las primeras etapas del desarrollo cerebral, tuvo un efecto favorable en la prevención de trastornos neurológicos (Pudell y cols., 2014); de la misma manera, existen datos recientes en los que se ha demostrado la sensibilidad que se presenta en las regiones de los bulbos olfatorios al déficit de ácidos grasos omega 3, produciendo una disminución en la tasa de incorporación a la membrana, o una disminución de la actividad enzimática; por lo tanto, se ha implementado el uso de diversas mezclas de ácidos grasos poliinsaturados, para mejorar las funciones cognitivas, de las cuales se encontró que la mezcla conformada por el ácido alfa-linolénico ($\Omega - 3$) y ácido linoleico ($\Omega - 6$) en proporción 1:4, posee una marcada efectividad para mejorar los procesos neurodegenerativos, generados por los cambios bioquímicos que alteran la plasticidad neuronal y producen síntomas característicos en la EA (Yehuda y Rabinovitz, 2015).

Además del aceite de pescado, existen algunos aceites vegetales que también poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y monoinsaturados (AGMI), en especial los ácidos grasos omega 3 y 6 (Solfrizzi,

2017). El aceite del fruto de *Persea americana* (Aguacate Hass.), se ha demostrado que posee un efecto protector frente a las alteraciones mitocondriales en el proceso de fosforilación oxidativa (Ortiz-Ávila y cols., 2015b). El fruto *Persea americana* posee una importante cantidad de nutrientes esenciales y fitoquímicos tales como carotenoides, tocoferoles, vitaminas tales como la A, C, E y K, además de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) que constituyen la mayor proporción de 71 % y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), en un porcentaje de 13 % (Ortiz-Ávila y cols., 2015a; Dreher y Davenport, 2013), además de los ácidos grasos presentes en el aceite, destaca la presencia de la vitamina E (α -tocoferol), un antioxidante esencial en la dieta humana que posee un efecto protector y estabilizador de los ácidos grasos que conforman la membrana celular frente a procesos oxidativos. En la EA existe una marcada disfunción mitocondrial provocada por los procesos oxidativos; dado que las membranas mitocondriales están conformadas en gran medida por ácidos grasos poliinsaturados, estos resultan ser altamente susceptibles a procesos de peroxidación lipídica, debido al aumento en la producción de EROs, los cuales alteran su estructura y provocan la pérdida de función al igual que las proteínas que forman parte de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Ortiz-Ávila y cols., 2015b). Cabe mencionar que aproximadamente el 90 % del ATP utilizado en los diversos mecanismos dependientes de energía en el cerebro provienen de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, por lo tanto, es de gran importancia el mantenimiento óptimo del proceso de fosforilación oxidativa, para el adecuado suministro de energía neuronal, por ello es esencial la suplementación con compuestos antioxidantes (Dong y cols., 2018; Solfrizzi, 2017).

Por tanto, se recomienda que la ingesta de alimentos ricos en AGPI-CL esté acompañada del consumo de compuestos antioxidantes como la vitamina E en cantidades adecuadas, pues ambos nutrientes contribuyen a la protección de las estructuras membranales neuronales y la función neuronal para la prevención de la EA (Dong y cols., 2018). En 2017, Ortiz-Ávila y colaboradores reportaron las propiedades protectoras del aceite de aguacate, frente al estrés oxidativo

mitocondrial en células renales de ratas diabéticas, en donde se observó una disminución de los niveles de EROs y la conservación e integridad de los citocromos de los complejos en la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual se atribuyó a la gran variedad de antioxidantes presentes en el aceite, y a la presencia del AGPI-CL: ALA, cuyos derivados enzimáticos DHA y EPA, poseen un efecto protector en el complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria (Ortiz- Ávila y cols., 2017).

Así mismo, Ortiz- Ávila y colaboradores (2015) reportaron en otro estudio, el efecto del aceite de aguacate en tejido neuronal de ratas diabéticas con encefalopatía, los resultados mostraron que el consumo de aceite de aguacate previene la alteración membranar en neuronas, reduciendo los niveles de EROs y previniendo el proceso de peroxidación lipídica y disfunción mitocondrial, a través de la conservación de la estructura de los componentes en la cadena respiratoria, contribuyendo a una adecuada función mitocondrial (Ortiz- Ávila y cols., 2015b). Por otro lado, también se ha reportado el mismo efecto protector del aceite de aguacate en el hígado de ratas diabéticas (Fernando y cols., 2015).

2.15 Receptor de serotonina 5-HT_{2C} en la Enfermedad de Alzheimer y el efecto de los AGPI-CL sobre su expresión.

Uno de los principales sistemas de neurotransmisión afectados por la progresión de la EA, es el sistema serotoninérgico, el cual posee un papel importante en las funciones cognitivas como la memoria a corto y largo plazo; la mayoría de las neuronas serotoninérgicas se encuentran ubicadas en el núcleo magno del rafe y sus proyecciones se distribuyen hacia áreas relacionadas con funciones cognitivas superiores como corteza frontal, corteza temporal e hipocampo. La activación de estas vías ocurre a través de la modulación de otros neurotransmisores entre los que se incluye el colinérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, GABAérgico (Gulyaeva y cols., 2017); y mediante la activación de distintos tipos de receptores, entre los que se han identificado siete clases distintas: los receptores 5HT_{1,2,4-7} que se encuentran acoplados al sistema de las proteínas G, y el receptor 5HT₃ que es

un canal iónico dependiente de ligando (Carhart-Harris y Nutt, 2017; Oba y cols., 2013; Clemett y cols., 2000).

En los pacientes con EA se ha mostrado una disminución de la actividad del sistema serotoninérgico tanto central como periférico, relacionada con una reducción en la concentración de serotonina en conjunto con una alteración de la expresión de receptores serotoninérgicos en áreas como la neocorteza y el hipocampo, lo cual se encuentra directamente relacionado con la pérdida de neuronas serotoninérgicas en el núcleo rafe y sus conexiones hacia la corteza y el hipocampo. Estas alteraciones producen un daño cognitivo que se observa como un incremento en la severidad de la demencia y puede ser determinado a través de diversas evaluaciones cognitivas como el puntaje MMSE (por sus siglas en inglés Mini-Mental State Examination) y la presencia de síntomas psicológicos como depresión, ansiedad, incremento en la agresividad, apatía, alucinaciones, delirios, desregulación del apetito y comportamiento motor aberrante. Los principales tres receptores que se encuentran relacionados con estos síntomas conductuales y psicológicos de la demencia (por sus siglas en inglés: BPSD) son el 5HT_{1A}, 2A, y 2C de los cuales, se ha reportado que polimorfismos y alteraciones en la expresión (incremento) del receptor de serotonina 2C (5HT_{2C} R) en pacientes con EA en específico está asociado al incremento de ansiedad, alucinaciones visuales e hiperfagia (Martins y cols., 2012; Assal y cols., 2004; Holmes y cols., 2003).

El receptor de serotonina 2C (5HT_{2C} R) es un receptor acoplado a proteína G que fue inicialmente identificado en el plexo coroideo de tejido neuronal aislado porcino, consiste en una proteína de 460 aminoácidos con un peso aproximado de 51.91 kDa (Clemett y cols., 2000), este se encuentra ampliamente expresado en el SNC de mamíferos como ratas y humanos, específicamente en regiones de la corteza (incluyendo piriforme y frontal), núcleo olfatorio anterior, las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, amígdala, materia gris periacueductal, núcleo accumbens, así como en hipotálamo y tronco estriado (Millan, 2005; Clemett y cols., 2000). Cabe destacar que su presencia en corteza frontal, indica su asociación a funciones relacionadas

con la cognición y emociones, se ha encontrado que en corteza frontal de rata están expresados principalmente en las células piramidales e interneuronas GABAérgicas con especial abundancia entre las capas V y VI (Santana y Artigas, 2017).

El 5HT_{2C} R es de tipo excitatorio y se encuentra acoplado a proteína Gq, por lo tanto, estimula la actividad de la enzima fosfolipasa C, produciendo la hidrólisis de fosfatidil inositol lo que genera moléculas que actúan como segundos mensajeros: el inositol-1,4,5-trifosfato y diacilglicerol que a su vez promueven la apertura de canales, incrementando así la concentración intracelular de calcio (Fongang y cols., 2019). Dentro de las principales funciones que involucra la activación del 5HT_{2C} R en el SNC de mamíferos están la actividad locomotora, estado anímico, ansiedad, apetito, patrones de sueño, recompensa, agresión, percepción, memoria de miedo, función sexual, atención y función neuroendocrina, según la región cerebral en la que se encuentren ubicados (Begdache, 2018; Millan, 2005; Clemett y cols., 2000), dado que ejerce una función moduladora de la actividad de neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas (Begdache, 2018; Millan, 2005); así mismo, se ha reportado en modelos animales que el bloqueo del 5HT_{2C} R puede afectar el proceso de aprendizaje (Nebuka y cols., 2020). Este receptor se encuentra particularmente ligado a la obesidad ya que se ha encontrado que en ratones mutantes KO de 5HT_{2C} se vuelven obesos debido a la ingesta incrementada de alimento, al igual que tras la administración de fármacos antagonistas como la agomelatina que bloquean los receptores ubicados en la región hipotalámica, se produce el incremento de la ingesta (Santana y Artigas, 2017; Sargent et al., 1997), por el contrario la administración de agonistas como la m-clorofenilpiperazina (mCPP) induce una reducción de la ingesta de alimento, alterar patrones de sueño, ansiedad y estimular secreción de prolactina (Millan, 2005).

En modelos animales se han encontrado cambios en la expresión del receptor 5HT_{2C}. Able y colaboradores encontraron una tendencia al incremento del mRNA que codifica para el receptor 5HT_{2C} en corteza frontal en ratas que tenían una dieta deficiente de AGPI omega 3 (Able y cols., 2014). En otro estudio se comparó el

efecto de una dieta alta en grasas saturadas en comparación con otras dos: una con alto contenido de AGPI omega 3 y otra en AGPI omega 6, los resultados mostraron que hubo una disminución en la unión al receptor 5HT_{2C} en los animales con una dieta alta en grasas saturadas en comparación con los animales que llevaban una dieta con AGPI, esto se observó principalmente en las zonas del núcleo mamilar y la corteza frontal, lo cual posiblemente se explica debido al cambio en la dinámica membranal por la alta ingesta de grasas saturadas, lo cual está estrechamente relacionado con alteraciones a nivel conductual (Dubois y cols., 2014).

En el presente estudio se seleccionó como modelo para representar la EA ratas *Wistar* bulbectomizadas con el objetivo de evaluar el efecto de los fitonutrientes neuroprotectores del aceite de *Persea americana* sobre los principales marcadores de neurodegeneración conductuales y bioquímicos característicos de la EA.

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer representa más del 60% de los casos registrados de demencia en adultos mayores y una de las principales causas de muerte a nivel mundial de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, cuya incidencia va en incremento, se prevé que dentro de las próximas cinco décadas la incidencia se triplique, representando altos costos para el sistema de salud y baja productividad; en México se ha previsto un incremento en el riesgo de padecer la EA en la población, lo cual está relacionado directamente a los hábitos dietéticos y el estilo de vida actual, siendo uno de los países con mayores índices de enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes e hipercolesterolemia. Por lo tanto, se considera de gran importancia el desarrollo de información útil en cuanto a agentes terapéuticos y preventivos.

Se propone la administración del aceite del fruto de *Persea americana* (aguacate Hass), que es un producto nacional de gran importancia con el 30% de la producción mundial anual. Además, se caracteriza por un alto contenido de nutrientes esenciales y fitoquímicos, entre los cuales destacan para nuestro estudio los ácidos grasos poliinsaturados y la vitamina E que de acuerdo con estudios previos ambos componentes tienen un efecto neuroprotector, frente a enfermedades neurodegenerativas como la EA, específicamente en la variante de inicio tardío, por lo cual creemos que la presencia de estos componentes en el aceite de aguacate, podrían tener un efecto favorable sobre los marcadores característicos de la enfermedad de Alzheimer en el modelo de ratas bulbectomizadas. Cabe resaltar que a la fecha no hay estudios realizados los efectos del consumo de aceite de *Persea americana*, sobre los marcadores característicos de la enfermedad de Alzheimer, principalmente sobre el proceso de neuroinflamación, deposición del péptido β A y los niveles en la expresión de receptores serotoninérgicos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El aceite de *P. americana* reduce el proceso neurodegenerativo característico de la Enfermedad de Alzheimer y la expresión del receptor de 5-HT_{2C} en el modelo murino con bulbectomía olfatoria bilateral?

5. HIPÓTESIS

El aceite de *P. americana* disminuye los niveles de los marcadores de daño característicos del proceso neurodegenerativo de la Enfermedad de Alzheimer (EA) en el modelo murino con bulbectomía olfatoria bilateral.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del aceite de *Persea americana* como agente neuroprotector, en el modelo murino para la enfermedad de Alzheimer inducido por bulbectomía olfatoria bilateral.

6.2 Objetivos específicos

1. Inducir la Enfermedad de Alzheimer en ratas macho *Wistar*, mediante el procedimiento quirúrgico de bulbectomía olfatoria bilateral.
2. Evaluar funciones cognitivas en el modelo murino bulbectomizado mediante pruebas conductuales durante el tratamiento de aceite de *P. americana*: Prueba de Laberinto radial de ocho brazos y Prueba de reconocimiento de objeto nuevo.
3. Examinar el efecto del tratamiento con aceite de *P. americana* sobre los niveles de proteína tau total presente en corteza frontal en los grupos de estudio.
4. Determinar los niveles de GSH/GSSG y la actividad de la enzima catalasa en la región de la corteza frontal mediante análisis colorimétrico.
5. Conocer el efecto del aceite de *P. americana* sobre los niveles de expresión del receptor de serotonina 5HT_{2c} en corteza frontal de las ratas OBX y controles por la técnica de inmunofluorescencia.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

Equipo

- Bisturí.
- Equipo de fresadora dental.
- Aspirador quirúrgico dental.
- Gasas.
- Sutura quirúrgica reabsorbible.
- 50 pipetas de vidrio de 2 mm de diámetro.
- Cronómetro.
- Centrífuga Allegra 64R, Beckman Coulter®
- 4 micropipetas 1ml, 100µL, 50 µL y 10 µL y sus respectivas puntillas de plástico.
- Tubos de plástico eppendorf® de 2 mL.
- Balanza analítica.
- Homogenizador Ultra Turrax® T25 basic.
- Espectrofotómetro NanoDrop® ND1000 y lector de placas ELISA.
- Crióstato Leica® CM1850.
- Microplacas de polipropileno.
- Caja para prueba de reconocimiento de objeto nuevo.
- Aparato laberinto de 8 brazos para prueba conductual.
- Objetos de distintos colores, formas y texturas.
- Lámina cubreobjetos fluoromount-G® (Southern Biotech).
- Microscopio confocal Zeiss LSM-700.

Reactivos

- Solución antiséptica quirúrgica de Yodo al 10 %.
- Agua destilada.
- Solución fisiológica (NaCl 85 %).
- Etanol 100 %.
- Solución antiséptica de etanol al 70 %.
- Paracetamol 40 mg /kg.
- Penicilina 6 UI.
- Pentobarbital sódico 40 mg /kg.
- Tampón de lisis con un 1 % de inhibidor de proteínas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.).
- Reactivo de Bradford: en un litro contiene 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol y 100 mL de ácido fosfórico al 85 %.
- Paraformaldehído al 4 %.
- Tampón fosfato salino (PBS) 0.1M a pH de 7.4 con 0.25 % Triton (PBST).
- Solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato al 0.1M.
- Suero de albúmina bovina al 3 % (BSA).
- Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-5HT_{2C} (catálogo: G0604, sc-108020 1:200, Santa Cruz, biotechnology).
- Anticuerpo IgG secundario anti- conejo de cabra conjugado con el colorante fluorescente Alexa Fluor® 488 (1: 1000, Invitrogen, EUA).

7.2 Desarrollo experimental

CUADRO METODOLÓGICO

Objetivo general: Evaluar el efecto del aceite de *Persea americana* como agente neuroprotector, en el modelo murino para la enfermedad de Alzheimer inducido por bulbectomía olfatoria bilateral.

1. Se realizó la cirugía de Bulbectomía Olfatoria Bilateral (OBX) en ratas *Wistar*

Tratamiento

Se llevó a cabo el tratamiento con aceite de *P. americana* al 10%, vía oral por 18 semanas.

2. De forma simultanea se llevaron a cabo las pruebas conductuales de memoria a corto y largo plazo.

Decapitación y obtención de tejido neuronal de corteza frontal

Análisis de marcadores representativos de la EA.

3. Determinación de niveles de proteína tau total por *western blot*.

4. Determinación de los niveles de GSH/GSSG y la actividad de la enzima catalasa en la región de la corteza frontal mediante análisis colorimétrico.

5. Evaluación de la expresión del receptor 5HT_{2c} en corteza frontal por inmunofluorescencia

Análisis estadístico de los resultados obtenidos

Discusiones y conclusiones

7.2.1 Tiempo de habituación

Para el presente estudio se seleccionó como modelo *in vivo*, ratas macho de la cepa *Wistar* (200 a 250 g de peso corporal), las cuales fueron alojadas de forma individual en jaulas de policarbonato, bajo condiciones estándar de temperatura (21-23 °C), con ciclos alternos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno y acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron cuidados siguiendo las directrices de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicaciones de NIH No. 8023, 1978) y la Norma Oficial Mexicana NOM- 062-ZOO- 1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, además el proyecto fue previamente aprobado por el Comité de bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (n° de oficio: CBQ19/026). El período de habituación establecido para los animales al espacio del bioterio fue de dos semanas.

7.2.2 Diseño experimental

Una vez concluido el período de habituación los animales fueron separados aleatoriamente en cinco grupos con un total de cinco sujetos cada uno; Grupo 1: animales controles sanos con dieta estándar; Grupo 2: controles sanos con alimento suplementado con aceite de *P. americana*; Grupo 3: Ratas OBX + alimento adicionado con aceite de *P. americana*; Grupo 4: ratas OBX con dieta estándar y el Grupo 5: Ratas *Sham* con dieta estándar. Para las pruebas conductuales se consideraron todos los roedores de cada grupo (entre 6-8) y se utilizó el tejido encefálico de un total de 19 roedores para la extracción de proteínas (grupo 1 y 2 con 5 ratas cada uno y los grupos 3,4 y 5 con 3 ratas cada uno) y 15 encéfalos para la evaluación de la expresión del receptor 5HT_{2C} mediante la técnica de inmunohistoquímica (3 ratas por grupo), sumando un total de 34 roedores.

La administración del aceite de *P. americana* se realizó diariamente, vía oral a razón de 1 ml por cada 250 gramos de peso, por un período de 18 semanas (Ortiz-Ávila y cols., 2015). Para este estudio se utilizó el aceite comercial de *P. americana* extra-

virgen extraído por el método de prensado en frío, en presentación comercial (Aceitera MEVI S.A. de C.V., México). El peso de los animales en conjunto con la ingesta de alimentos fue registrado desde el comienzo, hasta el final del período de tratamiento.

7.2.3. Bulbectomía Olfatoria Bilateral

El procedimiento quirúrgico para la extirpación de los bulbos olfatorios, se llevó a cabo de acuerdo con el método modificado propuesto por Primeaux (Primeaux, Barnes y Bray, 2007), en el Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología del centro de Ciencias básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. En primer lugar, se aplicó anestesia a los animales vía intraperitoneal con 40 mg / Kg de pentobarbital sódico de acuerdo con la NOM- 062- ZOO- 1999; para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico previamente se fijó el animal de cada una de sus extremidades a una plancha de microcirugía para roedores, posteriormente se procedió con la asepsia en la parte superior y frontal de la piel del cráneo, se llevó a cabo la exposición de la parte superior del cráneo mediante una incisión superficial en la línea media con un bisturí y se realizaron dos orificios de 2 mm de diámetro, ubicados a 1 mm derecha e izquierda de la línea media rostral y 6 mm por encima de la sutura bregma. Ambos bulbos olfatorios fueron succionados con una pipeta de vidrio de 2 mm de diámetro conectada a un sistema de vacío. Todo ello se realizó tomando las debidas precauciones para no dañar la corteza cerebral. Después de revisar la totalidad de la bulbectomía, la incisión de la piel fue suturada con sutura absorbible de 4 ceros. Las ratas *Sham* fueron sometidas al mismo procedimiento quirúrgico, hasta la exposición de los bulbos olfatorios sin dañarlos. Una vez concluido el proceso de la bulbectomía olfatoria se administró antibiótico penicilina procaína (6000UI/ vía intramuscular cada 24 horas/ tres días) con la finalidad de reducir el riesgo a infecciones. Como analgésico se utilizó paracetamol a una dosis de 24 mg / Kg. Las ratas fueron alojadas en jaulas independientes, para evitar agresiones debido al comportamiento predatorio exacerbado por la cirugía. Los animales fueron sometidos a los siguientes procedimientos experimentales a las

dos semanas post cirugía. La extensión de la lesión fue evaluada mediante las alteraciones observadas en las pruebas conductuales post- operatorias. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados y se llevó a cabo la verificación de la totalidad de la bulbectomía; así mismo, se revisó el área operatoria del hueso para determinar la posible presencia de remanentes olfatorios.

7.2.4 Pruebas de comportamiento.

7.2.4.1 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo.

El objetivo de esta prueba de comportamiento fue evaluar la memoria de reconocimiento a corto plazo en roedores, en la cual se evalúa la capacidad del animal de reconocer entre un objeto presentado previamente de uno novedoso, con base en las características físicas de los objetos presentados; esta prueba se aplica especialmente en roedores que presentan un daño en las regiones de corteza cerebral e hipocampo. La prueba fue dividida en 3 etapas principales: habituación, familiarización y fase de prueba (**figura 3**). Durante la fase de habituación las ratas se colocaron en un campo abierto en ausencia de los objetos con el propósito de que se familiarizaran con el entorno, enseguida la rata fue regresada a su jaula de retención, 24 horas después, durante la segunda etapa de familiarización, se colocaron 2 objetos (de 5 cm de altura) iguales (A+A) de forma equidistante a 20 cm de distancia de las esquinas de la caja; para dar inicio a esta etapa la rata se colocó en el centro de la pared de espaldas hacia los objetos, luego se permitió la exploración de los objetos por 5 minutos, una vez concluidos se proporcionó un intervalo de retención 90 minutos, para dar posteriormente inicio a la fase de prueba, donde el animal se regresó al campo abierto en base al mismo procedimiento que la etapa de familiarización pero con la diferencia de que uno de los objetos fue idéntico al que se mostró en la etapa de familiarización y el otro fue reemplazado por un objeto nuevo (A + B), la duración de esta fase fue de 5 minutos. El campo en el que se realizaron las pruebas fue de forma cuadrada con medidas de 1.5 × 1.5 m de 50 cm de altura, fabricado con madera en color blanco. Durante la prueba

los roedores exploraron su ambiente cercano, al mover de manera rítmica sus vibrisas faciales obteniendo información, no sólo de la forma, sino del tamaño, localización y textura del objeto, de manera que es posible evaluar los procesos de memoria episódica en las ratas, por lo tanto el proceso exploratorio, fue registrado cuando los animales dirigieron su nariz hacia el objeto a una distancia de 2 cm o menos o bien, si éstos tocaron el objeto, con la punta de su nariz o patas delanteras. Finalmente se registró la frecuencia y el tiempo dedicado por los animales, a la interacción con cada uno de los objetos nuevos, y se calculó el índice de Reconocimiento de Objeto Nuevo (por sus siglas en inglés NORI) a través de las siguientes fórmulas:

NORI= número de interacciones con el objeto nuevo / número total de interacciones.

Posteriormente se estimaron los promedios y el error estándar de los porcentajes de frecuencia de interacción con cada objeto y se realizó un análisis ANOVA de dos vías, con una prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones del NORI entre los grupos de estudio.

Prueba de reconocimiento de objeto nuevo.



Figura 4. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo. Modificada de Redrobe y cols., 2010, *Frontiers of Psychiatry*.

7.2.4.2 Prueba de comportamiento del laberinto radial de ocho brazos.

Durante esta prueba se evaluó la memoria de referencia y la memoria de trabajo, es una prueba comúnmente utilizada para examinar los efectos del daño en las áreas de la corteza prelímbica (PLC) y el hipocampo, dado que el hipocampo está involucrado tanto en el trabajo espacial, como en la memoria de referencia.

Aparato: se utilizó un laberinto radial de ocho brazos (longitud del brazo 50 cm, ancho del brazo: 14 cm, diámetro del cubo 40 cm y altura 40 cm, elevado 50 cm por encima del piso) fabricado con madera oscura. El procedimiento se realizó de acuerdo con el diseño de Mendiola- Precoma y cols. en 2017.

Previo al inicio cada fase de la prueba se restringió el acceso a la botella de agua por un periodo de 24 h. Esta prueba se llevó a cabo en todos los sujetos de estudio:

Pre- habituación: en esta etapa se expuso por primera vez al roedor al espacio interior del laberinto con el objetivo de que el animal se familiarizara con el entorno. Al inicio de esta fase se colocó al animal en el centro del laberinto y se permitió una exploración de 5 minutos, una vez finalizado este tiempo se retiró nuevamente el animal y se colocó dentro de su jaula; 24 horas después se llevó a cabo la siguiente fase de habituación.

Habituación: Este proceso se realizó 3 veces por día, para asegurar que los animales se encontraran familiarizados con el espacio dentro del laberinto, previo a esta fase se colocaron objetos diferentes a la entrada de cada brazo como referencias visuales.

Se colocó una botella como recompensa de agua en dos de los ocho brazos del laberinto. Al comienzo de cada sesión de habituación, se colocó la rata en el brazo de inicio del laberinto y posteriormente se permitió la exploración por todo el aparato por un máximo de cinco minutos durante los cuales se registró el tiempo en el que la rata encontró el brazo con acceso libre al bebedero.

Prueba: consistió en tres fases; entrenamiento, retraso y prueba, que corresponden con las tres etapas de la memoria de trabajo (codificación, retención y recuperación) (**Figura 4**). Los sujetos se evaluaron 3 veces al día. Durante la primera fase de habituación, se colocaron 2 brazos con acceso al agua de beber. Siguiendo el mismo procedimiento que la fase de habituación, se registró el tiempo de la toma de recompensa y al finalizar los cinco minutos de prueba, el animal se colocó nuevamente en su jaula, la duración del retraso fue de un mes, con la finalidad de evaluar la memoria a largo plazo. En la siguiente fase de prueba, se llevó a cabo el mismo procedimiento que la fase anterior, donde nuevamente se registró la cantidad de tomas de recompensa y el tiempo en el que accedió a ella. El objetivo fue evaluar la capacidad que tuvo el animal para recordar qué brazos fueron cebados previamente e ingresarlos para recibir una recompensa de agua.

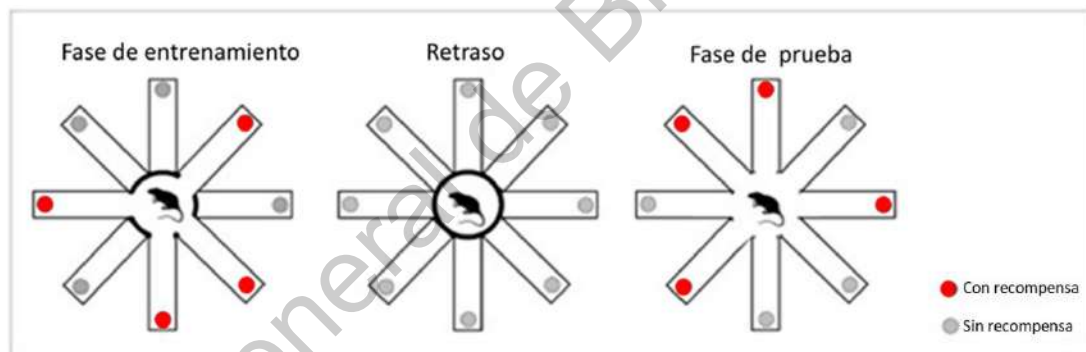


Figura 5. La prueba consta de 3 fases: entrenamiento, retraso y fase de prueba. Modificado de: Richter y cols. 2013, Where have I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression.

Una entrada positiva a un brazo se registró cuando la rata colocó las cuatro patas en dentro del brazo. Finalmente, se evaluaron dos tipos de memoria: la memoria de referencia se registró cuando las ratas solo visitaron los brazos del laberinto que contenían la recompensa, cuando entraron a un brazo incorrecto (sin recompensa) se interpretó como un error en la memoria de referencia. En cambio, la memoria de trabajo se evaluó cuando las ratas entraron en cada brazo una sola vez, la reentrada

en los brazos resultaría en un error de memoria de trabajo. A partir de esto, se analizaron las medidas de comportamiento, tanto para el entrenamiento como para la fase de prueba: latencia para llegar al sitio de agua potable, número de entradas totales de brazos, número de entradas de brazo correctas y errores de memoria de referencia y trabajo cometidos. Se calcularon las puntuaciones relativas de error para comparar errores de memoria entre fases (entrenamiento, prueba), se corrigieron los recuentos de errores en el modelo de ratas bulbectomizadas, tomando en cuenta el número total de entradas a brazos, con las siguientes fórmulas:

$$\text{Errores en la memoria de referencia} = \frac{\text{(Entradas incorrectas)}}{\text{(Entradas totales)}}$$

$$\text{Errores en la memoria de trabajo} = \frac{\text{(Reentradas)}}{\text{(Entradas totales)}}$$

Ambas pruebas conductuales se realizaron sin causar sufrimiento, ni lesiones en los animales, respetando los lineamientos de la NOM- 062- ZOO- 1999.

7.2.5 Aislamiento de tejido, purificación y cuantificación de proteínas.

Inmediatamente después de las pruebas de comportamiento se llevó a cabo el proceso de eutanasia, para lo cual se utilizó una sobredosis de pentobarbital sódico (superior a 40 mg / Kg), posteriormente los animales fueron decapitados, conforme a los procedimientos éticos establecidos por la NOM- 062- ZOO- 1999, enseguida se extrajo el encéfalo del cráneo e inmediatamente se llevó a cabo la disección del hipocampo y la corteza cerebral, para después colocar los tejidos en congelación en un recipiente con nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizó la homogenización de los tejidos donde se mezcló cada uno con 500 µL de tampón de lisis con un 1% de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.) el tejido se

homogenizó utilizando el homogenizador Ultra-turrax® y posteriormente el homogenizado se centrifugó durante 15 min a 8,000 rpm con una temperatura de 4 ° C, se recuperó el sobrenadante y nuevamente se llevó a centrifugación por 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se procedió a realizar la cuantificación del contenido total proteico mediante el método de Bradford, realizando previamente una curva de calibración con BSA para determinar la concentración de proteína total de cada muestra, se registró la absorbancia mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND1000.

7.2.6 Determinación de tau total por *Western blot*.

El procedimiento de *Western blot* utilizado fue de acuerdo con los protocolos estándar. Se separaron un total de 50 µg de proteínas totales cuantificadas de los homogeneizados de corteza frontal, usando electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (gel de corrida) y 4% (gel concentrador) posteriormente fue electrotransferido a membranas de fluoruro de polivinilideno de 0.45 µm (PVDF) A 220 mA durante 1 h a 4°C. Después se realizó un bloqueo de las membranas con un 3% de bloqueador de grado de transferencia en PBS durante 2 h y media, luego las proteínas en la membrana se sondearon con los anticuerpos primarios específicos anti- tau a 4°C con agitación suave durante la noche, posteriormente, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) a 37°C durante 45 min. Después, la inmunoreactividad de la proteína tau se visualizó con reactivo de detección ECL y se evaluó cada banda obtenida por la densitometría, la concentración de proteína se normalizó con β- actina.

Anticuerpo	Marca	Lote	Especie de origen	Dilución
Primario				
Tau (policlonal, IgG)	Santacruz Biotechnology	C0416	Cabra	1:300
β - actina	Invitrogen	-	Cabra	1:1000
Secundario				
HRP, conejo anti-cabra	Invitrogen	RL2388655A	Conejo	1:1000

7.2.9 Inmunofluorescencia para la localización del receptor 5HT_{2C}.

7.2.9.1 Preparación de tejido para inmunohistoquímica.

Se llevó a cabo un procesamiento y aislamiento específico. Una vez transcurridas 24 h posteriores a las pruebas de comportamiento, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg / Kg) vía intraperitoneal y perfundidas por vía cardiaca con paraformaldehído al 4%. Enseguida, se retiró el tejido cerebral del cráneo y éste fue fijado en solución de paraformaldehído al 4% a 4°C durante 12 horas; posteriormente, se llevó a cabo el proceso de crioprotección, en el cual el tejido, se colocó en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato al 0.1M a 4°C, durante 8 horas.

7.2.9.2 Preparación de las criosecciones.

Enseguida, se llevó a cabo la criosección de los cerebros en láminas de tejido, para lo cual se utilizó un crióstato marca Leica®, donde se obtuvieron secciones coronales seriadas de 12 μ m de espesor de las regiones del hipocampo y la corteza frontal cerebral, posteriormente se colocaron en un portaobjetos y se almacenaron a 4°C; se llevaron a cabo dos lavados de 10 min cada uno, en tampón fosfato salino (PBS) 0.1M a pH de 7.4 con 0.25 % Tritón (PBST).

7.2.9.3 Determinación de inmunofluorescencia del receptor 5HT_{2C} en el tejido.

Enseguida se realizó una pre-incubación de las secciones obtenidas durante 30 min con PBST con albumina sérica bovina (BSA) al 3 % para bloquear los sitios inespecíficos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-5HT_{2C} (cat: sc-10802, lote: G0604 1:200, Santa cruz, biotechnology, EUA.) durante toda la noche a 4°C, una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con PBST por 10 min. Enseguida las secciones se incubaron durante 24h con el anticuerpo IgG secundario anti- conejo de cabra, conjugado con el colorante fluorescente Alexa Fluor® 488 (1: 1000, Invitrogen, EUA), para luego lavar nuevamente las secciones con PBST (X3). Los cortes fueron protegidos con una lámina cubreobjetos fluoromount–G® (Southern Biotech). Una vez terminadas las laminillas, se obtuvieron las imágenes del hipocampo y corteza cerebral utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM-700, utilizando aumentos de 10x, 20x y 40x.

7.2.10 Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el software para estadística GraphPad Prism Software 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con una p menor al 5%. Así mismo se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos vías y una vía y se procedió a realizar un análisis de comparaciones múltiples *post hoc* o comparaciones *a posteriori* con el método de *Bonferroni* para los datos obtenidos de los diferentes grupos.

8. RESULTADOS

8.1 Monitoreo del peso corporal.

El peso corporal es un indicador del estado de salud general en los organismos, en el presente estudio los animales fueron alimentados con dos clases de dietas: la dieta estándar y la suplementada con aceite de *P. americana* al 10%, por lo que se monitoreó el peso de los animales de forma mensual, con la finalidad de determinar cambios significativos en el peso corporal antes, durante y al final del tratamiento, derivado de la cirugía y de la administración del aceite de *P. americana*.

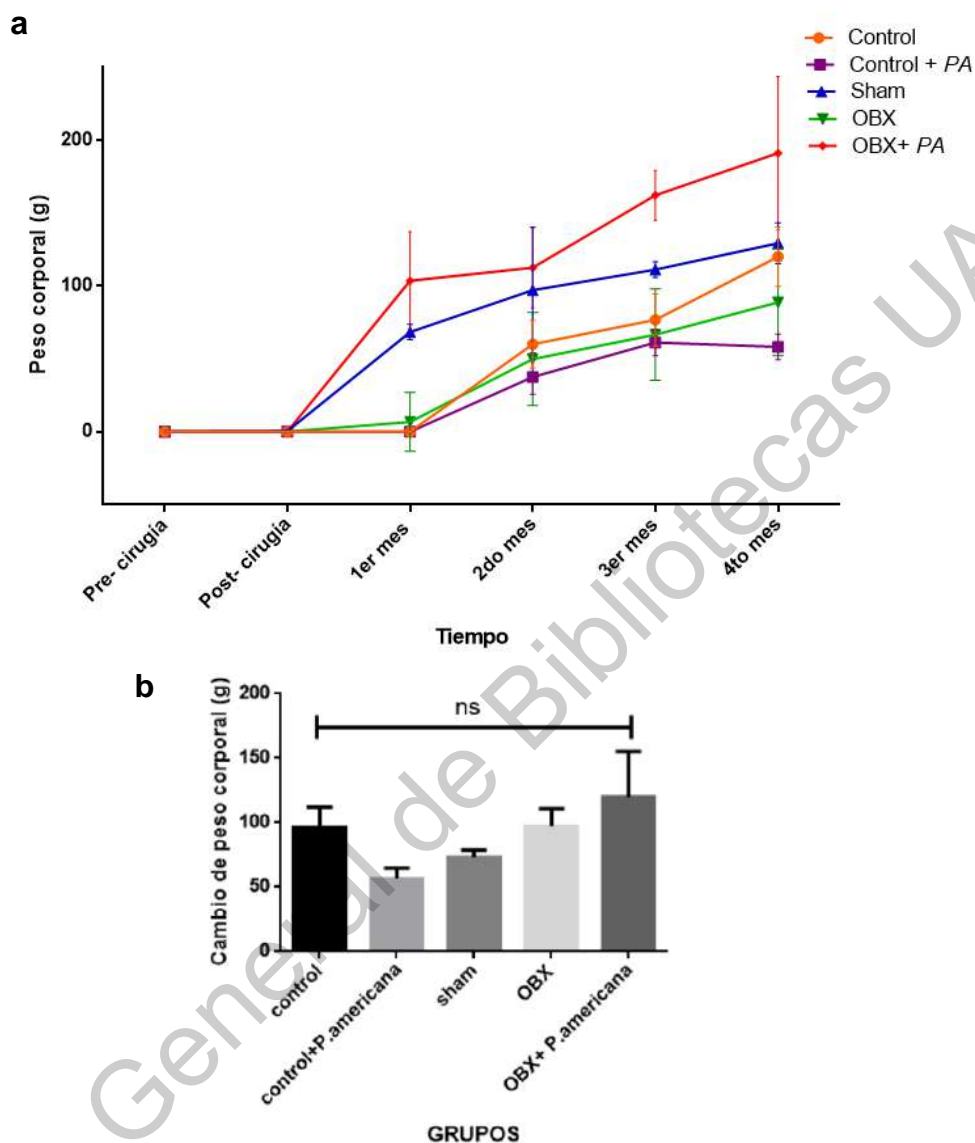


Figura 6. (a) Curva de peso corporal de los diferentes grupos de estudio. La gráfica muestra el peso corporal en gramos de los diferentes grupos de estudio, antes y después de la OBX, así como al inicio, durante y al final del tratamiento. (b) Cambio de peso corporal entre los grupos. El gráfico indica la comparación entre las diferencias de peso desde el inicio hasta el final del tratamiento en cada uno de los grupos. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas más dieta con aceite de *P. americana*. Los datos son presentados como la media \pm SEM (n=6-8 sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Bonferroni. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo, ns: no significativo.

Los resultados obtenidos del monitoreo de peso corporal se muestran de la siguiente manera, la figura 6a señala la evolución del peso corporal promedio de cada uno de los grupos con respecto al tiempo, desde antes y después de la cirugía en los grupos OBX y *sham*; así como del inicio al final del tratamiento en todos los grupos de estudio, cabe resaltar que todos los grupos presentaron una ganancia de peso durante el tiempo que fueron alimentados con las diferentes dietas, se observó que el grupo OBX con la suplementación de aceite de *P. americana* al 10 %, llegó a pesar hasta 600 gramos en promedio. Por otro lado, en la figura 6b se muestra la media de la diferencia de peso de cada uno de los grupos de estudio al inicio del tratamiento, en comparación con la diferencia al final del tratamiento, todas las diferencias fueron positivas, por lo cual, se interpreta como un incremento del peso corporal en todos los animales con respecto al tiempo. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas en el cambio de peso entre los grupos antes y después del tratamiento ($p < 0.05$); sin embargo, cabe señalar que el grupo control + *P. americana* es el que presentó menor incremento en peso.

8.2 Evaluación conductual para la determinación del estado de memoria.

8.2.1 Prueba conductual del Laberinto Radial de Ocho Brazos.

La prueba conductual del laberinto radial de ocho brazos se realiza con el objetivo de evaluar el estado cognitivo de los sujetos de estudio, específicamente ante los efectos de posible daño en áreas de la corteza pre-límbica (PLC) y el hipocampo, dado que son zonas cerebrales que se encuentran involucradas con la memoria de orientación espacial; este tipo de evaluación conductual permitió conocer el estado de memoria espacial, tanto a corto plazo como a largo plazo.

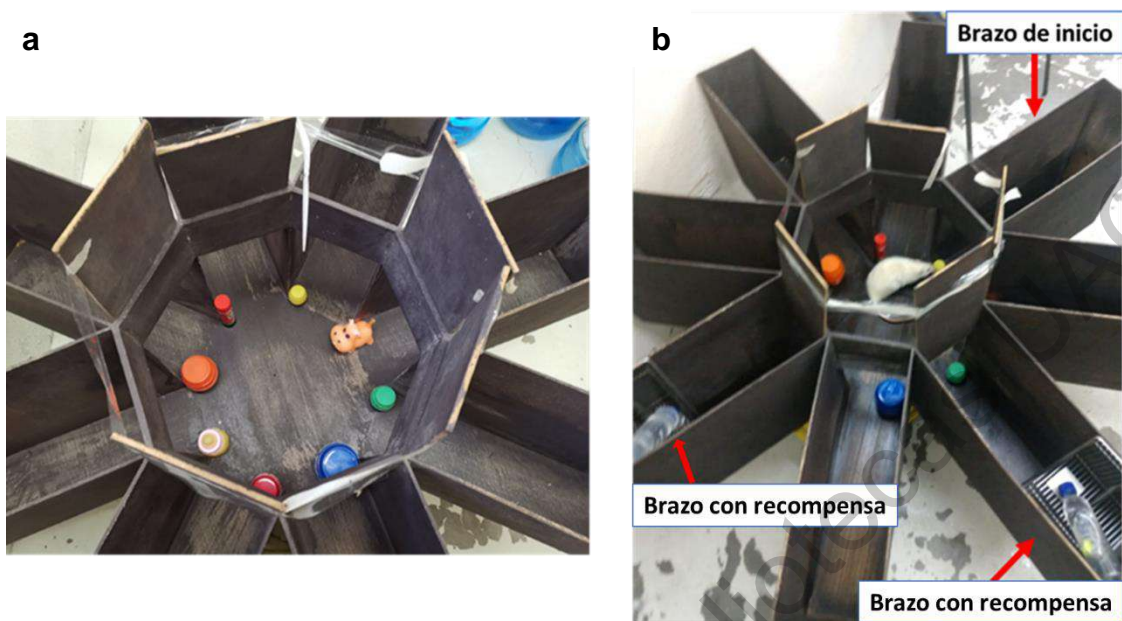


Figura 7. (a) Identificación de la disposición de los ocho brazos en el laberinto radial. La imagen muestra la identificación de los brazos con la presencia de un objeto diferente a la entrada de cada brazo del laberinto. (b) Brazos de inicio y cebados. La imagen presenta el brazo marcado como inicio de la prueba y los dos brazos con la recompensa de agua.

Evaluación de Memoria de referencia (MR).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la memoria de referencia (MR) que es un tipo de memoria a largo plazo, la cual se encuentra basada en la evaluación de la capacidad del roedor de reconocer el brazo del laberinto que contiene la recompensa, considerando un tiempo de retención de un mes entre cada una de las fases de exposición al laberinto, si el animal realiza una entrada a un brazo sin recompensa, se conoce como error en la memoria de referencia; por lo tanto esta evaluación cognitiva hace posible conocer el estado cognitivo de los animales de cada grupo, con base en la cantidad de errores relativos cometidos durante cada fase de la prueba.

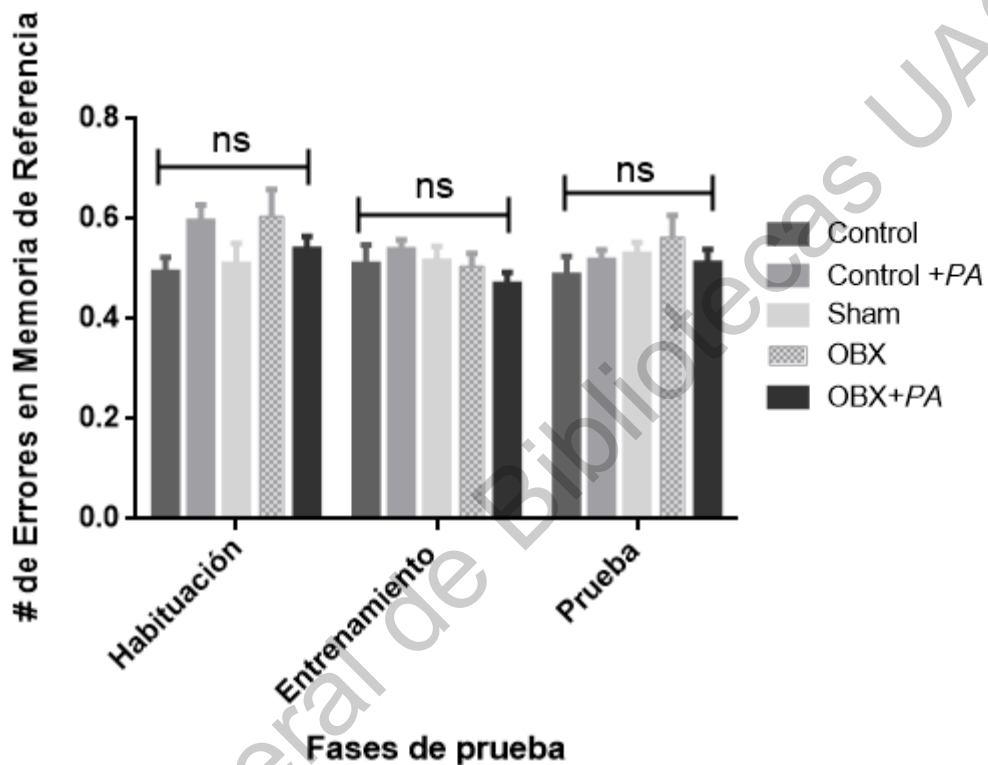


Figura 8. Memoria de referencia (MR). El gráfico muestra la comparación del número relativo de errores en la memoria de referencia (entradas incorrectas) entre los grupos de estudio en las fases de habituación, entrenamiento y prueba. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*. Los datos son presentados como la media \pm SEM ($n=6-8$ sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías, con una prueba *post hoc* de Bonferroni. ns $p > 0.05$: no significativo.

La figura 8 muestra los resultados del análisis del número de errores en memoria de referencia que son el número de entradas a brazos sin recompensa, normalizado con el total de entradas durante cada fase de la prueba, el análisis indicó que durante las fases de habituación y entrenamiento no hay diferencia significativa

entre los errores de referencia entre los grupos ($p > 0.05$), así mismo, no se observó diferencia significativa en el número de errores en MR entre los grupos OBX y OBX + *P. americana*.

Evaluación de Memoria de trabajo (MT).

La memoria de trabajo es un tipo de memoria espacial a corto plazo que se evalúa en el transcurso del mismo ensayo (durante los 5 minutos de duración), donde la capacidad cognitiva y el estado de memoria a corto plazo son aceptables si el animal visita una sola vez cada brazo sin recompensa de lo contrario, si el roedor realiza una reentrada a un brazo no cebado, se genera lo que se conoce como un error en la memoria de trabajo (MT).

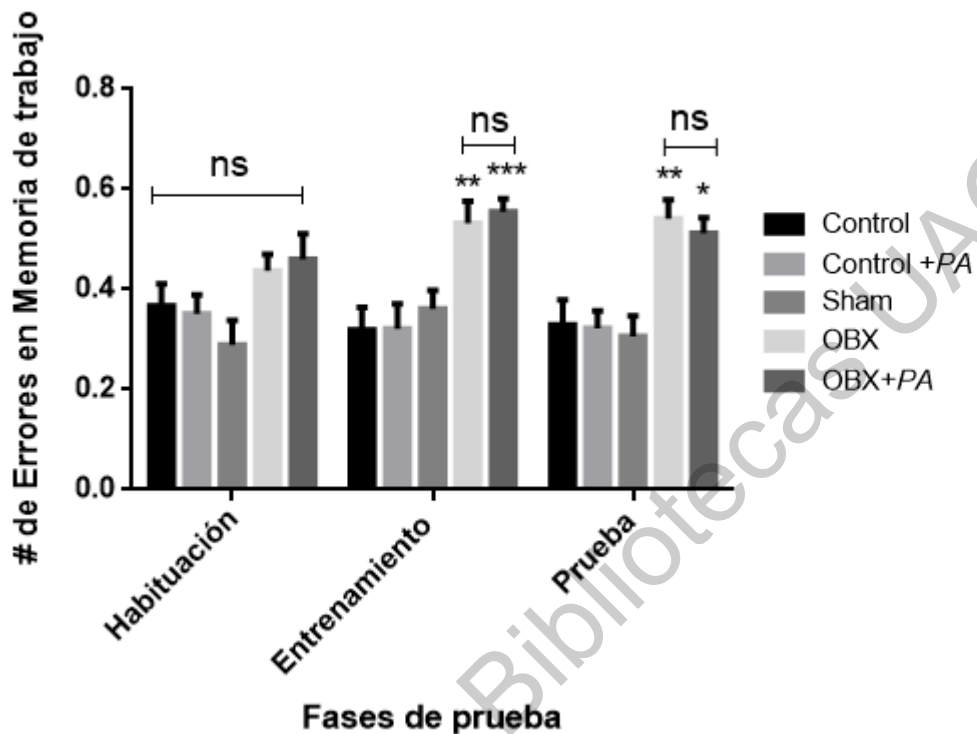


Figura 9. Memoria de trabajo (MR). El gráfico muestra la comparación del número relativo de errores en la memoria de trabajo (reentradas incorrectas) entre los grupos de estudio en las fases de habituación, entrenamiento y prueba. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*. Los datos son presentados como la media \pm SEM (n=6-8 sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni. ns $p > 0.05$: no significativo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

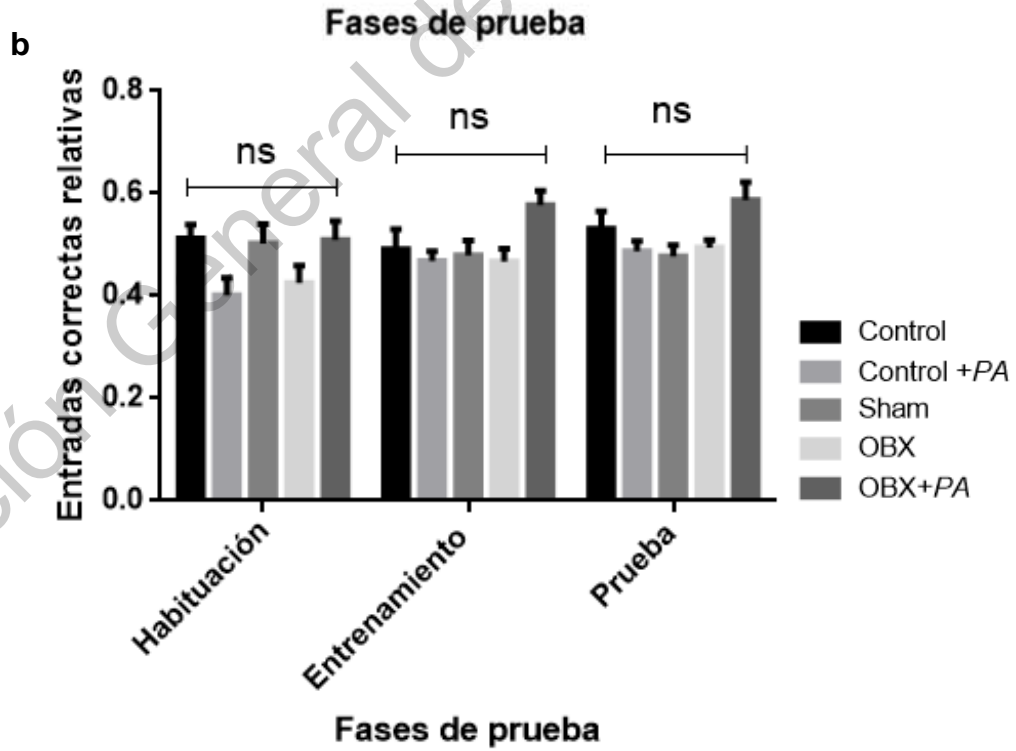
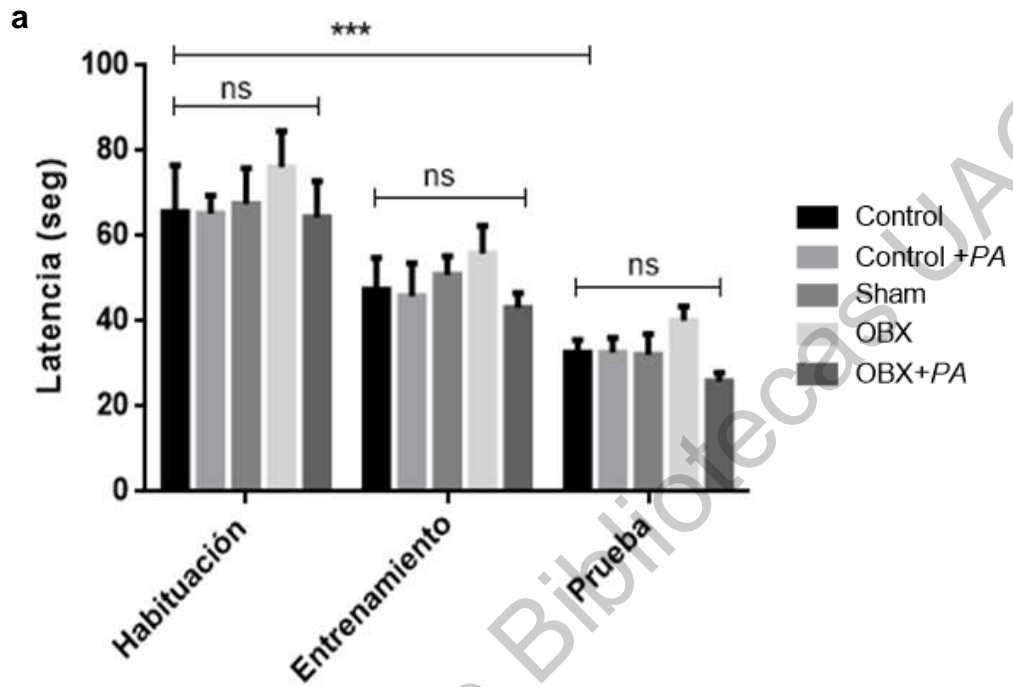
El análisis estadístico de los errores relativos en MT (figura 9) indicó que durante la fase de habituación no se observaron diferencias significativas entre los errores de los grupos de estudio ($p < 0.05$); sin embargo, durante la fase de entrenamiento y prueba se encontró un incremento significativo en el número de errores relativos de los grupos bulbectomizados con y sin tratamiento ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$), en comparación con los grupos control (Control, Control + *P. americana* y Sham), sin embargo, es posible observar una tendencia a la baja en el grupo OBX

suplementado con el aceite de *P. americana* en el número de errores en la memoria de trabajo durante la fase de prueba.

Número de entradas totales, entradas correctas y latencia.

Otros parámetros que son considerados en esta evaluación conductual son el número de entradas correctas, entradas totales y la latencia que corresponde al tiempo que tardan los animales en encontrar la recompensa de agua desde el momento en el que son liberados en el laberinto; los resultados se muestran en la figura 10.

Dirección General de Bibliotecas UNQ



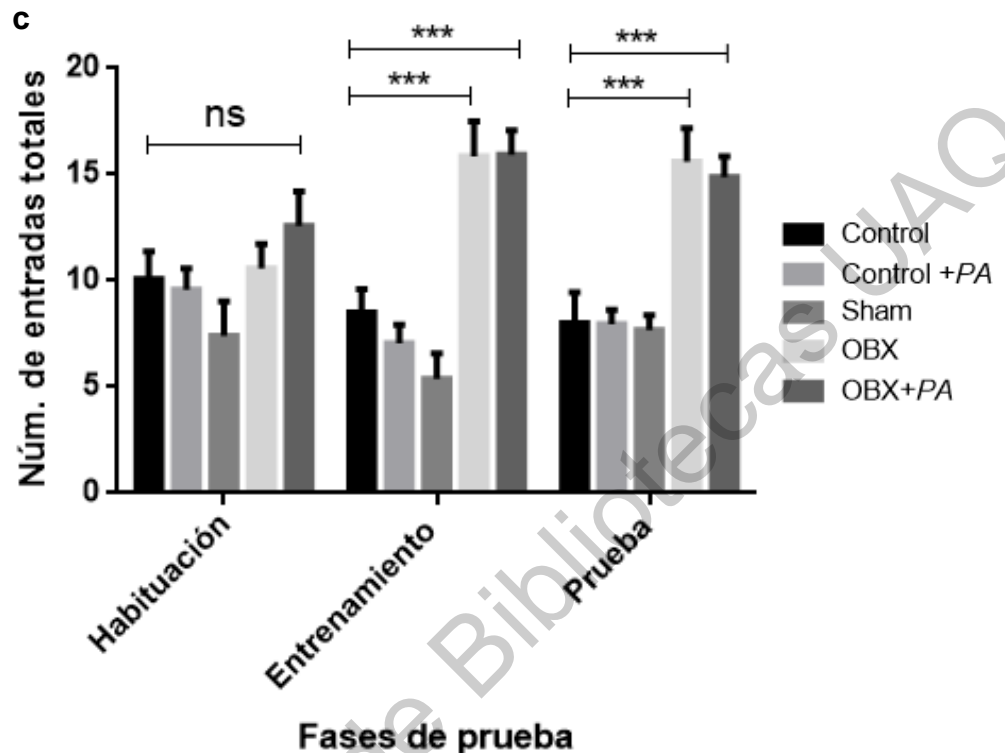


Figura 10. Parámetros adicionales; (a) **Latencia en toma de recompensa.** El gráfico muestra la comparación de la latencia (tiempo que duran los animales en tomar la recompensa) entre los grupos de estudio en las fases de habituación, entrenamiento y prueba. (b) **Entradas correctas.** La figura expresa la comparación del número de entradas correctas al laberinto relativas entre los grupos de estudio en las distintas fases de la evaluación. (c) **Entradas totales.** En el gráfico se presenta la comparación del número de entradas totales entre los grupos, en las tres fases de la prueba del laberinto radial. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*. Los datos son presentados como la media \pm SEM ($n=6-8$ sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni. ns, $p > 0.05$: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El análisis del parámetro referente a la latencia de toma de recompensa (figura 10a) no mostró diferencias significativas entre los grupos de cada fase ($p < 0.05$); sin embargo, cabe destacar que los resultados mostraron una disminución significativa de la latencia para toma de recompensa desde la fase de habituación a la fase de

prueba ($p < 0.001$). Otro parámetro considerado en el análisis para confirmar el estado de memoria de los animales fue la cuantificación del número de entradas correctas a los brazos (figura 10b) (brazos con recompensa), en donde los resultados indicaron que en ninguna de las fases de la prueba hubo diferencias significativas de entradas correctas relativas entre los grupos de estudio ($p < 0.05$). El análisis estadístico del número total de entradas (figura 10c) indicó que durante la fase de habituación, no hubo diferencias significativas en los valores de entradas totales entre los grupos ($p < 0.05$); no obstante durante las fases de entrenamiento y prueba se observa un incremento significativo en el número total de entradas de los grupos bulbectomizados en comparación con los demás grupos control ($p < 0.001$), ya que hubo un incremento en la movilidad de los animales OBX durante las sesiones de prueba, con respecto a la movilidad de los animales con la presencia del bulbo olfatorio.

8.2.2 Prueba conductual de Reconocimiento de Objeto Nuevo.

La prueba de reconocimiento de objeto nuevo es una evaluación conductual para roedores basada en la capacidad que tienen para explorar objetos y espacios novedosos, esta prueba que se realiza con el propósito de evaluar si existe alguna lesión a nivel de las zonas del hipocampo y la corteza frontal, por medio de la cual se evalúa la memoria episódica que es un tipo de memoria explícita y está relacionada con la capacidad de recordar un evento en un lugar y tiempo específicos en el pasado, de manera que al evaluar a los sujetos sanos se espera que estos tengan la capacidad de reconocer un objeto nuevo de un objeto familiar, después de un tiempo de retención establecido (90 min), mediante la interacción con el objeto durante un periodo de 5 minutos. Cada interacción se consideró positiva cuando la punta de la nariz del animal se encontró a una distancia menor o igual a 2 cm (figura 11).

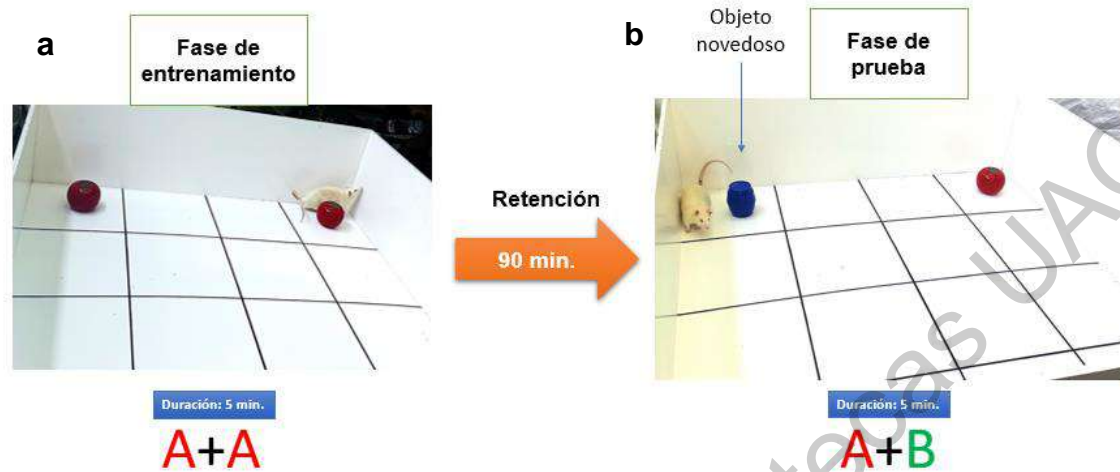


Figura 11. Fases de la prueba de Reconocimiento de Objeto Nuevo, separadas por un tiempo de retención de 90 min. **(a)** Fase de entrenamiento. La imagen muestra la disposición de los objetos iguales A+A y la duración de 5 minutos de cada ensayo. **(b)** Fase de prueba. Se observa la disposición de los objetos A+B en el campo.

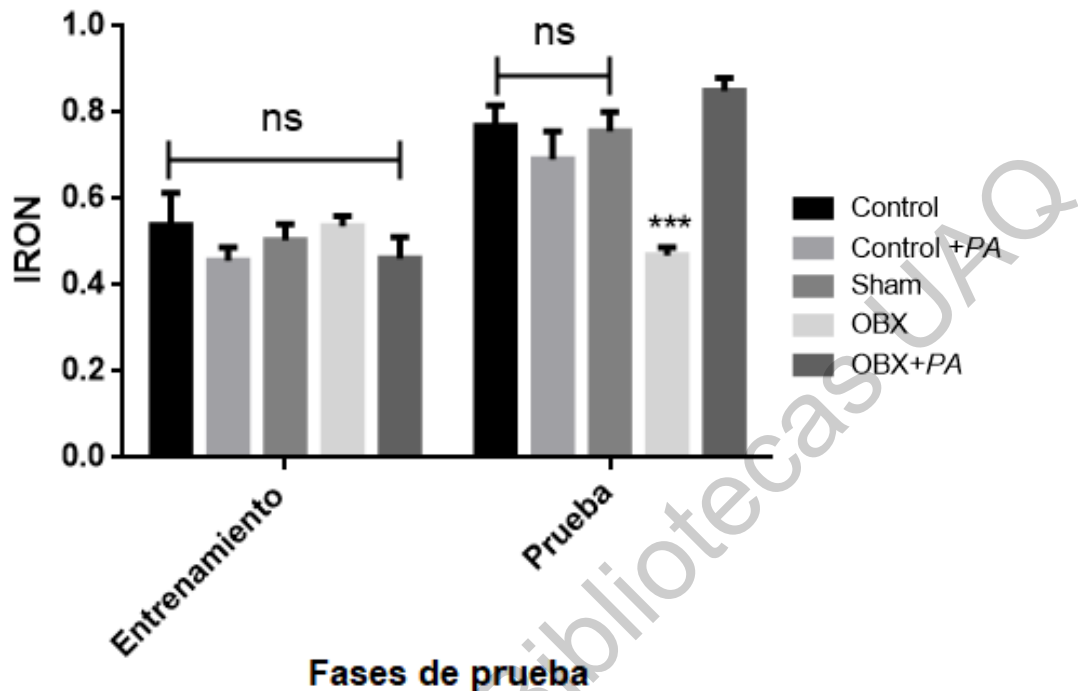


Figura 12. Índice de reconocimiento de objeto nuevo (NORI). El gráfico muestra la comparación del NORI entre los grupos de estudio en las fases de entrenamiento y prueba. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*. Los datos son presentados como la media \pm SEM (n=6-8 sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni. ns, $p > 0.05$: no significativo, *** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos de la prueba de reconocimiento de objeto nuevo (figura 12) indican que durante la fase de habituación no se observan diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$); mientras que durante la fase de prueba, el grupo OBX sin tratamiento presentó una disminución significativa del índice de reconocimiento de objeto nuevo (NORI) en comparación con los grupos control, control + *P. americana* y sham ($p < 0.001$); por otro lado el grupo OBX + *P. americana* presentó un incremento significativo del NORI con respecto al grupo OBX sin tratamiento ($p < 0.001$), con un valor similar al de los grupos control; por lo tanto se

observa una recuperación en el estado de memoria episódica en los roedores bulbectomizados, tras el tratamiento de la dieta suplementada con aceite de *P. americana*.

8.4 Determinación de los niveles de proteína tau en corteza frontal

La presencia de ovillos neurofibrilares es una marca histopatológica característica de la EA, la cual se ha encontrado en tejido *post mortem* de pacientes con demencia; los ovillos neurofibrilares que son agregados conformados por la proteína estabilizadora del citoesqueleto tau en un estado patológico de hiperfosforilación. Por lo tanto, para conocer si la administración de aceite de *P. americana* tiene algún efecto sobre los niveles de la proteína tau, se determinaron mediante la técnica de *Western blot* los posibles cambios en los niveles de proteína tau en corteza frontal entre los grupos de estudio.

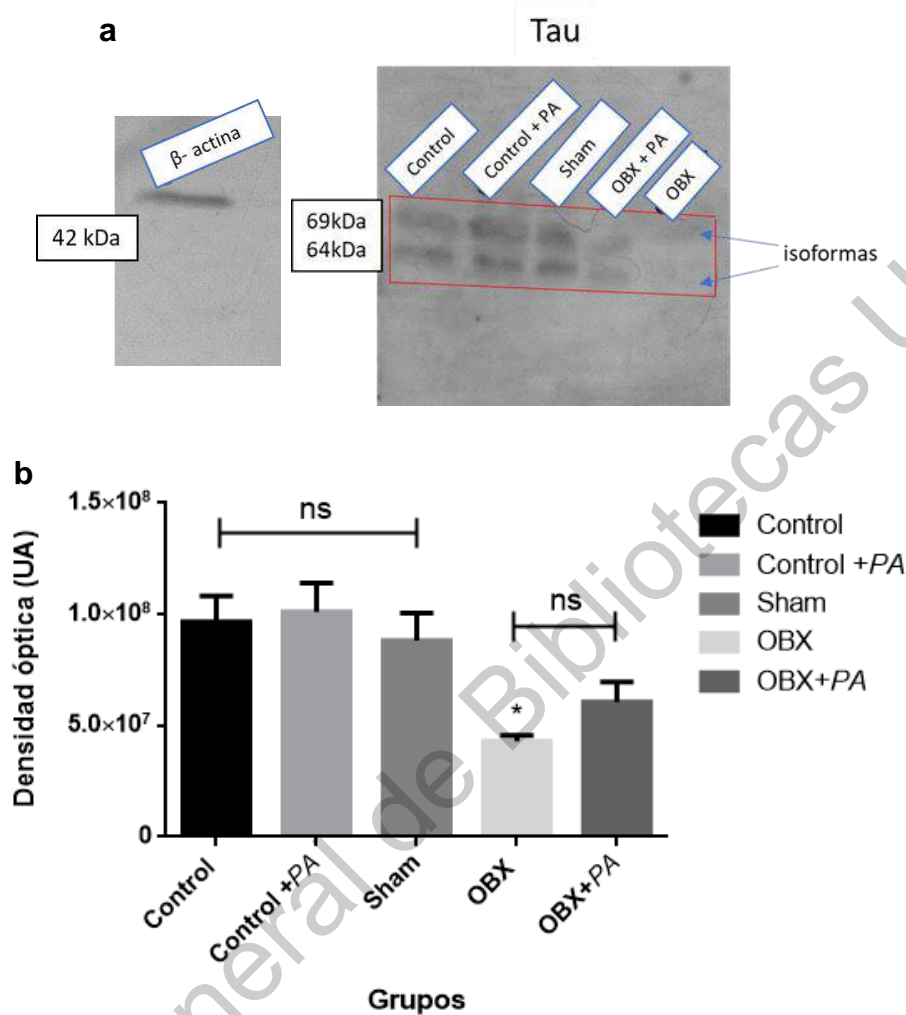


Figura 13. Análisis semicuantitativo de los niveles de proteína tau. **(a)** Se muestra la imagen del revelado del gel obtenido mediante la técnica de *Western blot* con ECL. **(b)** El gráfico indica la comparación de los valores de densidad óptica (DO) en unidades arbitrarias, entre los grupos de estudio. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*. Los datos son presentados en medias \pm SEM (n=3 sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Bonferroni. ns, $p < 0.05$; *, $p < 0.05$.

El análisis densitométrico de los resultados obtenidos mediante la técnica de *Western blot* se observa en la figura 13, específicamente en la figura 13b se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico de la densitometría de la banda de 69kDa, los cuales indican que los niveles de proteína tau en el grupo OBX sin tratamiento fueron significativamente menores ($p < 0.05$) con respecto a los grupos control y control+ PA; por otro lado, no se observa efecto significativo del aceite de *P. americana* sobre los niveles de proteína tau en el grupo OBX+ PA; pero es posible observar una tendencia a la restauración en los niveles proteína tau de modo que cabe la posibilidad de que en un tratamiento más prolongado pudiera verse la significancia. La concentración de proteína total contenida en cada muestra utilizada fue de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se obtuvo de la extracción de la fracción soluble de muestras de corteza frontal para cada uno de los grupos de estudio.

8.5 Determinación de los parámetros de estrés oxidativo en corteza frontal

Durante el proceso neuroinflamatorio en la EA se generan altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno y nítricas que provocan un daño oxidativo en distintos componentes celulares como las membranas lipídicas, así como en otras estructuras proteicas y ácidos nucleicos provocando la muerte neuronal, por lo tanto en el presente estudio se evaluaron los niveles de dos marcadores oxidativos, tales como los niveles de actividad en las enzimas catalasa y los niveles de glutatión en su forma reducida, para conocer el estado oxidativo, tras la ablación de los bulbos olfatorios como con la suplementación alimentaria de aceite de *P. americana*.

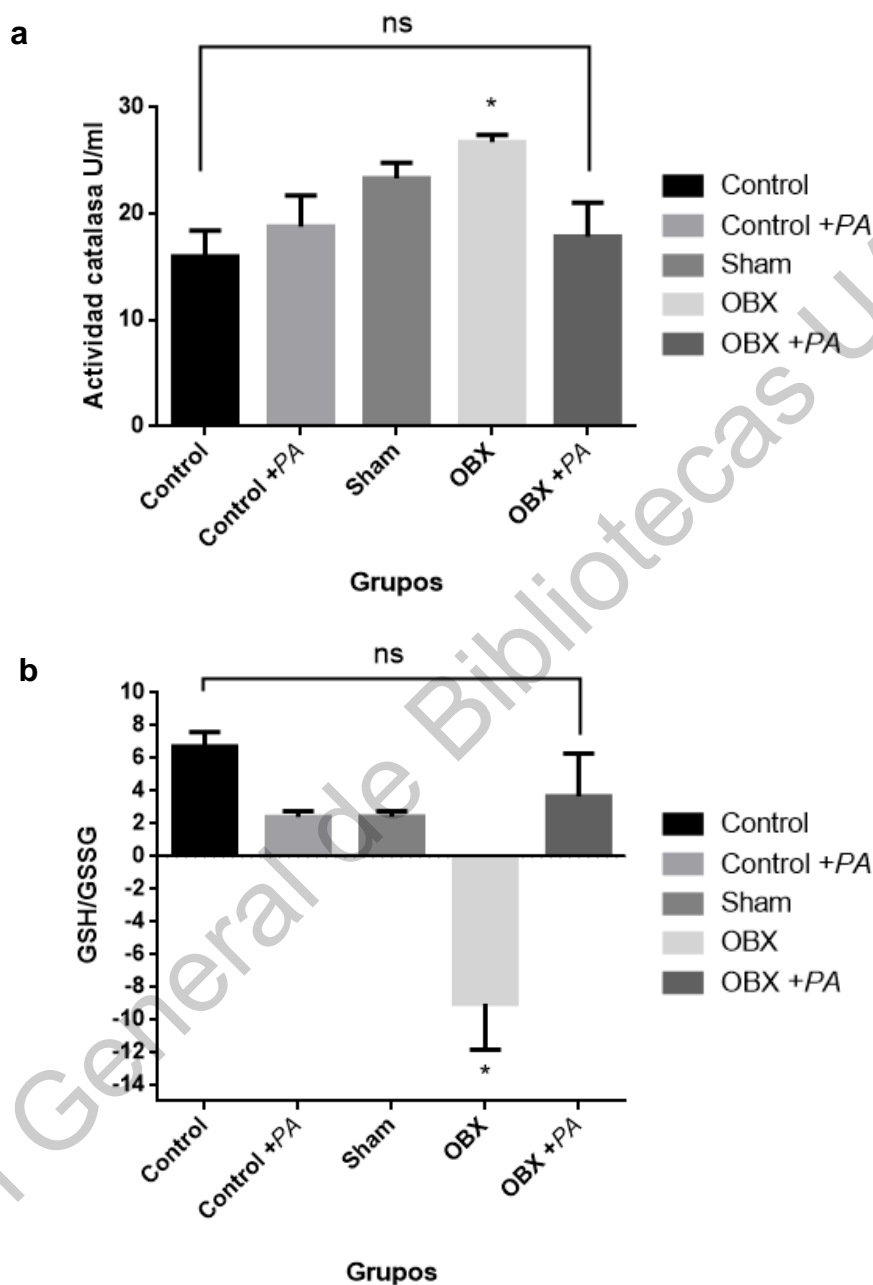


Figura 14. Determinación de los niveles de parámetros de estrés oxidativo. **(a)** El gráfico muestra los niveles de actividad de la enzima catalasa entre los grupos de estudio. **(b)** El gráfico indica los niveles de GSH/GSSG entre los grupos de estudio. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*. Los datos se presentan como la media ± SEM (n=3 sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Bonferroni. *p<0.05.

Los resultados de la cuantificación de estos parámetros se indican en la figura 14, el grafico 14a muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de la actividad enzimática de catalasa los cuales indicaron que en el grupo OBX ocurrió un incremento significativo en la actividad enzimática de catalasa en comparación con los grupos control, por otro lado se observó que los animales OBX suplementados con aceite de *P. americana* presentaron una reducción de la actividad catalasa, comparable a las de los grupos control. Igualmente, en la figura 14b se muestran los resultados de la relación de GSH/ GSSG, en donde se observa que el grupo de animales bulbectomizados presentó una proporción significativamente menor de glutatión en estado reducido, en comparación con los grupos control, así mismo, los animales OBX suplementados con aceite de *P. americana*, mostraron un incremento significativo de la relación GSH/GSSG a valores semejantes a los de los grupos control.

8.6 Inmunofluorescencia del receptor 5HT_{2c}

El receptor 5HT_{2c} se encuentra asociado a los síntomas conductuales y psicológicos de la demencia (BPSD), como depresión, alucinaciones, comportamiento motor aberrante (AMB) y ansiedad, por lo tanto, en el presente estudio analizamos el posible efecto de la suplementación del aceite de *P. americana* sobre la expresión del receptor 5HT_{2c} en la región de la corteza frontal.

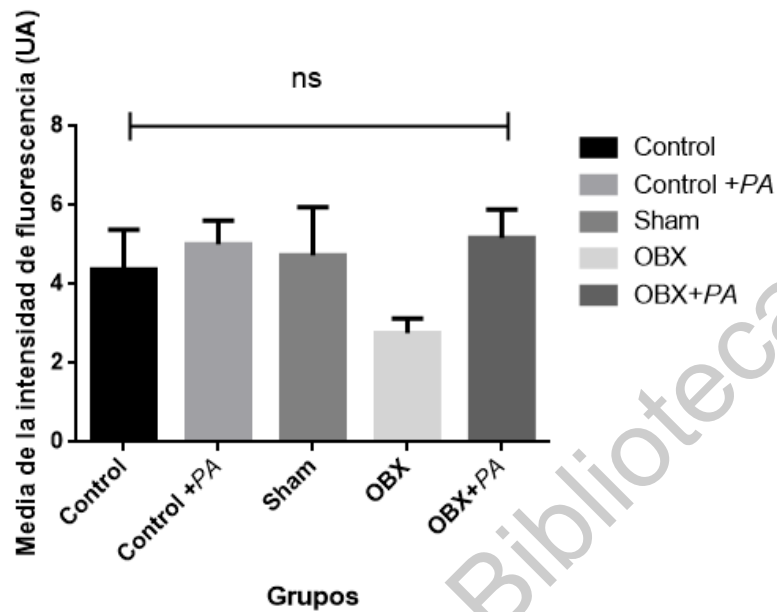


Figura 15. Determinación de los niveles de expresión del receptor 5HT_{2C}. El gráfico muestra los niveles de expresión del receptor 5HT_{2C} en corteza frontal en unidades arbitrarias de la media de la intensidad de la fluorescencia (MIF) entre los grupos de estudio. Abreviaturas: OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*. Los datos son presentados como la media \pm SEM (n=3 sujetos por grupo), el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Bonferroni. ns, $p < 0.05$.

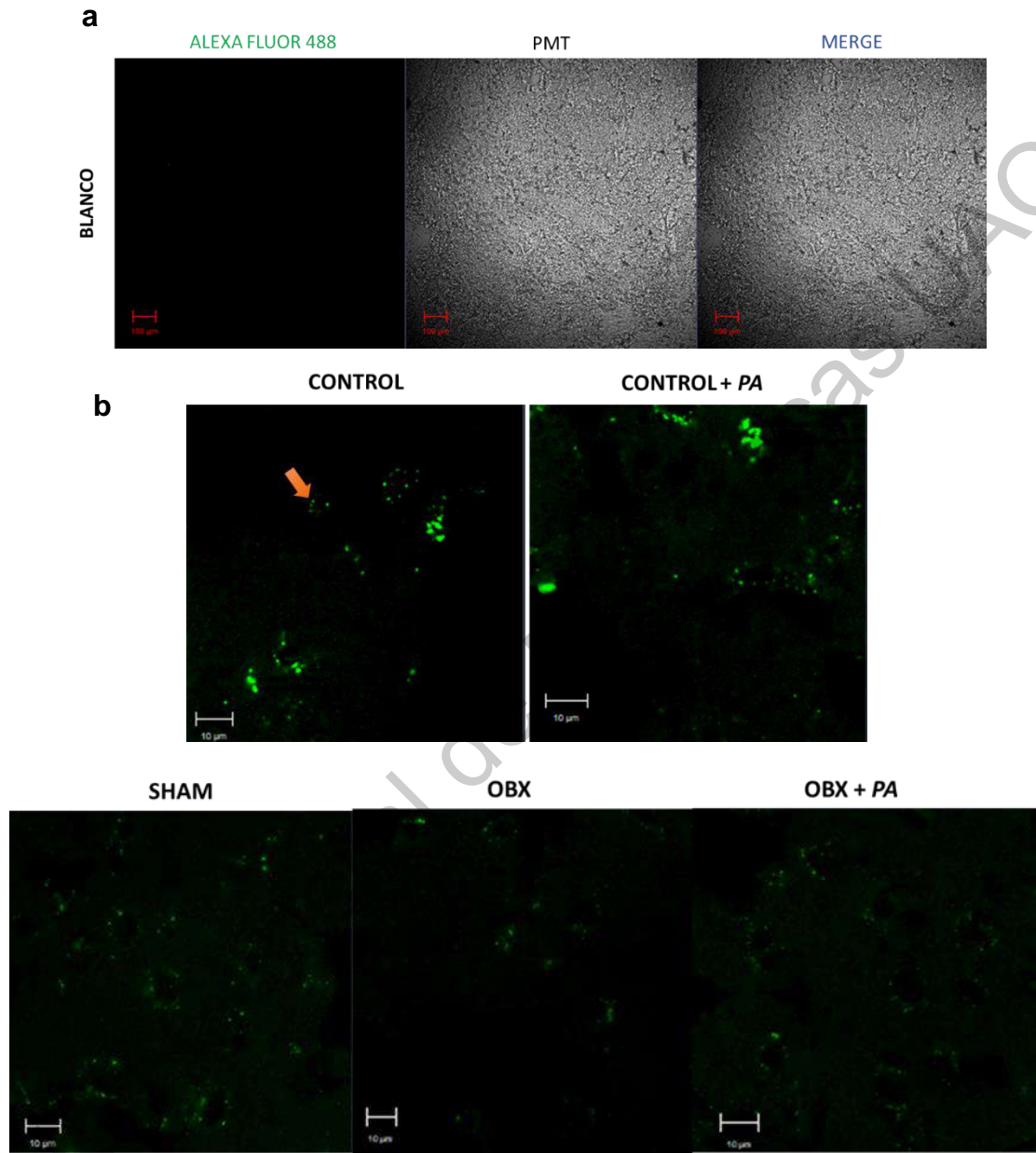


Figura 16. Micrografías de la inmunofluorescencia del receptor $5HT_{2C}$ con Alexa Fluor 488. **(a)** Micrografía que muestra el blanco obtenido en la técnica de inmunofluorescencia en aumento 10X, con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. **(b)** Las micrografías muestran las marcas correspondientes a la localización del receptor $5HT_{2C}$ en la corteza frontal de cada uno de los grupos de estudio con un aumento de 40X, la flecha en color naranja muestra la marca del receptor $5HT_{2C}$. Abreviaturas: PTM, tubo fotomultiplicador (por sus siglas en inglés Photomultiplier tube); OBX, ratas bulbectomizadas; OBX + PA, ratas bulbectomizadas con la dieta suplementada con aceite de *P. americana*.

Los resultados del análisis (Figura 15) indican que los niveles de expresión del receptor 5HT_{2C} en la región de la corteza frontal fue estadísticamente similar en todos los grupos de estudio; lo anterior, puede corroborarse en las micrografías obtenidas mediante la técnica de inmunofluorescencia (Figura 16a y b) donde se observan las marcas correspondientes a la unión del anticuerpo Alexa Fluor 488 con el anticuerpo primario dirigido al receptor 5HT_{2C} y su distribución en el tejido de corteza frontal con un aumento de 40X.

9. DISCUSIÓN

La dieta es considerada como un importante factor que influye en el estado de salud de los pacientes, por lo que una dieta deficiente o alta en grasas saturadas, puede contribuir al riesgo de padecer la EA (Mendiola-Precoma y cols. 2016); sin embargo, existen estudios realizados en pacientes con deterioro cognitivo en los que se han agregado algunos alimentos específicos con un alto contenido en nutrientes neuroprotectores como los ácidos grasos poliinsaturados (De la rubia y cols. 2018; Klimova y cols. 2019). En una revisión sistemática realizada por Solfrizzi y colaboradores encontraron que los adultos que manejan una dieta rica en macronutrientes como los AGMI y AGPI, además de micronutrientes como las vitaminas E, D y B (1,2,6 y 12), carotenoides y polifenoles, presentaron un mejor desempeño cognitivo en edades avanzadas (Solfrizzi y cols. 2017), así mismo, en estudios previos realizados en animales se ha descrito el efecto neuroprotector de las dietas enriquecidas con aceites vegetales que poseen un alto contenido de ácidos grasos insaturados (Batarseh y Kaddoumi, 2018; Lauretti y Praticò, 2017); en el presente trabajo se consideró de gran importancia evaluar el efecto neuroprotector del aceite de aguacate debido a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (71% del peso total) y poliinsaturados (13%) a la par de otros componentes con efecto antioxidante y neuroprotector como la luteína (271 µg por cada 100 g de fruto) (Dreher y Davenport, 2013); en un estudio realizado por Nolan y colaboradores en 2018 se administró una suplementación de carotenoides y AGPI

en los que se incluyeron: luteína , meso- zeaxantina y zeaxantina en una proporción de 10:10:2 mg con 430 mg de DHA y 90 mg de EPA, en pacientes con deterioro cognitivo, los resultados mostraron el efecto favorables frente al proceso neurodegenerativo de la EA.

El tratamiento administrado en el presente estudio se realizó por medio de una dieta suplementada al 10% con aceite de *P. americana* de acuerdo a Ortiz-Ávila y colaboradores en 2015, durante un periodo de 18 semanas, los resultados obtenidos del registro del peso corporal no indicaron una diferencia significativa en el aumento de peso entre los grupos de estudio; sin embargo, si fue posible observar una tendencia a la baja en el grupo control + *P. americana*; por lo tanto, es probable que en un modelo animal sano, el incremento del peso corporal se mantenga estable, lo anterior puede ser atribuido al efecto regulador del metabolismo lipídico de los AGPI y AGMI presentes en el aceite de aguacate, debido a que ejercen una regulación negativa de la lipogénesis hepática, mediante la disminución de la expresión de genes de proteínas que participan en la lipogénesis como la enzima ácido graso sintasa (por sus siglas en inglés FAS) y la esteroil-CoA desaturasa (Δ -9-desaturasa) (Rodríguez – Cruz y cols., 2005), así como la expresión del gen de la adipocina leptina (Fan y cols. 2011), a la par se ha demostrado que influyen en el incremento del mRNA y la actividad de enzimas relacionadas con el proceso oxidativo de ácidos grasos, como carnitina palmitoil transferasa- 2 y la acil-CoA oxidasa peroxisomal hepática, contribuyendo así a la disminución de los depósitos de grasa corporal (Ukropec y cols., 2003); por otro lado, Del Toro- Equihua y colaboradores en un estudio realizado con ratas de la cepa *Wistar*, administraron 2 dietas: una dieta alta en sucrosa que generó una alta resistencia a la insulina, y otra dieta suplementada al 30% con aceite de aguacate, observaron que la administración del aceite de aguacate incrementó la sensibilidad a la insulina en un 96.2%, permitiendo una ganancia de peso menor (incremento de peso estable) a diferencia del grupo con la dieta alta en sucrosa (Del Toro-Equihua y cols., 2016). En investigaciones realizadas en el presente año, se he demostrado que los

pacientes con la EA presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa provocado por una disminución de la sensibilidad a la insulina, la cual tiene una importante función neuroprotectora y un rol en la plasticidad sináptica y las funciones cognitivas (Aljanabi y cols., 2020; Dubey y cols., 2020).

Así mismo, cabe resaltar el impacto del modelo utilizado en este estudio debido a que se ha demostrado que los animales bulbectomizados frecuentemente presentan hiperfagia (Kalshetti y cols., 2015), lo cual posiblemente provocó el incremento de peso que se observó en los grupos bulbectomizados durante el tratamiento. En los grupos control se observó que la administración del aceite de *P. americana* no tuvo un impacto importante en el incremento de peso; sin embargo, el grupo bulbectomizado con dieta suplementada con aceite, presentó una tendencia al incremento de peso corporal. Lo anterior puede explicarse debido a que la ablación de los bulbos olfatorios en los roedores promueve el incremento en la expresión del neuropéptido Y hipotalámico, provocando un incremento de los depósitos de grasa corporal (Primeaux y cols., 2007), lo cual se observó en el grupo OBX+PA que presentó una mayor ingesta de alimento.

Además de los cambios en los patrones de alimentación, se ha encontrado que el procedimiento de bulbectomía olfatoria bilateral genera alteraciones a nivel conductual, histopatológico y bioquímico que son específicos de los mecanismos neurodegenerativos de la EA, tales como la disminución de volumen en las zonas del hipocampo, pérdida de la memoria y aprendizaje espacial, anhedonia, incremento en la ansiedad, irritabilidad, susceptibilidad ante estímulos estresantes y depresión; lo cual se observa en conjunto con alteraciones en los sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico, noradrenérgico y colinérgico, un incremento del estrés oxidativo, neuroinflamación y déficit energético, así como una mayor acumulación de péptido beta amiloide en las terminales nerviosas, que son algunas de las características observadas en los resultados del presente estudio (Yamada y cols., 2011; Almeida y cols., 2017; Gulyaeva y cols., 2017; Pilar-Cuellar y cols., 2019).

Las primeras evaluaciones para conocer el estado cognitivo de los animales fueron las pruebas conductuales. La prueba del laberinto radial de ocho brazos se realizó con la finalidad de evaluar la memoria espacial, que permite a los mamíferos recordar información de ubicación y orientación tridimensional en un determinado ambiente, esta capacidad permite la búsqueda y ubicación del alimento. En esta prueba se evaluaron dos tipos de memoria espacial: la memoria de trabajo y la memoria de referencia; de acuerdo con Kim y colaboradores en 2019 la memoria de trabajo es un tipo de memoria a corto plazo que involucra las redes neuronales de las zonas de la corteza frontal y la corteza premotora; mientras que la memoria de referencia evalúa la integridad y funcionamiento de las regiones del hipocampo y la corteza parietal posterior con la memoria de referencia (Dudchenko, 2004; Kim, 2019). Los resultados de la prueba del laberinto radial de ocho brazos mostraron que no hubo cambios significativos en la memoria de referencia en el modelo OBX y por ende con la administración del aceite de *P. americana*, por lo tanto no se vio afectada la memoria de largo plazo que involucra la región del hipocampo (Che, 2018), pues se ha encontrado que los individuos con daño en esta región presentan un cambio en la memoria de referencia, a la par de la pérdida en las capacidades de navegación y orientación espacial (Kim H. y cols., 2019); es posible que en un tratamiento realizado a un plazo más extenso sea posible encontrar un déficit en la memoria espacial a largo plazo.

El segundo parámetro de evaluación fue la memoria de trabajo, donde los resultados indicaron un incremento en el número de errores relativos correspondientes a la memoria de trabajo en los grupos bulbectomizados, lo cual indicó un posible daño en las regiones involucradas en este tipo de memoria como la corteza frontal, esto es consistente con lo reportado por Le X. y colaboradores quienes reportaron en un modelo OBX, un déficit en la memoria de trabajo en la tarea espacial de laberinto en Y (Le y cols., 2013); lo anterior también ha sido reportado en otros estudios donde se encontró que los roedores bulbectomizados

presentan un déficit en la memoria espacial de trabajo y no espacial a corto plazo (Yamada y cols., 2011; Sithisarn y cols., 2013).

Otro parámetro adicional de la prueba del laberinto radial de ocho brazos fue el número de entradas totales a brazos, donde se observó un incremento significativo en las entradas totales por parte de los grupos bulbectomizados (figura 10c), que coincide con lo reportado por Kalshetti y colaboradores en 2015, quienes observaron un incremento del 185% en el número total de entradas en los roedores bulbectomizados en comparación con el control (Kalshetti y cols., 2015); lo anterior, es atribuido a que los animales OBX sufren hiperactividad locomotora notoria incluso después de 8 semanas de la cirugía (Almeida y cols., 2017), provocada por alteraciones post-OBX, en el sistema dopaminérgico del núcleo estriado en los animales (Takahashi y cols., 2018), por esta razón la diferencia es mayor en las fase de entrenamiento y prueba en comparación con la fase de habituación. Por otro lado, no se observó cambio significativo en los parámetros de latencia (figura 10a) en toma de recompensa, creemos que posiblemente la hiperactividad locomotora acompañada de un incremento de velocidad en los animales OBX sesgó este parámetro, con lo cual los animales OBX entraron a una mayor cantidad de brazos que los animales no-OBX en el mismo período de tiempo, por lo tanto, el parámetro de latencia podría no reflejar el cambio en el estado cognitivo de los roedores. El siguiente parámetro fue el número de entradas correctas relativas en donde no se observó cambio significativo durante las tres fases de habituación, entrenamiento y prueba; sin embargo cabe resaltar que durante la fase de prueba se observó una ligera tendencia al incremento significativo en el número de entradas correctas relativas del grupo OBX con la administración de *P. americana* en comparación con los grupos OBX, *sham*, y control + *P. americana* (figura 10b), siendo comparable con los valores del grupo control, dado que entre los principales compuestos neuroprotectores del aceite de *P. americana* se encuentra el carotenoide luteína; estos resultados son consistentes con lo reportado por Al-Amin y colaboradores en 2016, quienes encontraron que el tratamiento con el carotenoide astaxantina en una

dosis de 20 mg/20 por cada mL de H₂O, produjo un incremento en el porcentaje de entradas correctas en el laberinto radial en un modelo murino de la EA por administración de cloruro de aluminio que fue comparable con el porcentaje del grupo control (Al- Amin y cols., 2016).

La memoria episódica es otro tipo de memoria a corto plazo que fue evaluada con la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, la cual es empleada para conocer el grado de daño a nivel de la región del lóbulo temporal medio (Nyberg y cols., 1996), principalmente en regiones parahipocampales como la corteza perirrinal, corteza temporal inferior y la corteza entorrinal, ésta última es la principal zona involucrada directamente con el reconocimiento de objetos (Antunes y Biala, 2012). Los resultados de la evaluación indicaron que el grupo OBX sin tratamiento mostró una disminución significativa en la memoria episódica a corto plazo con respecto a los grupos control; lo anterior es consistente con otros estudios en los que se reportó un incremento en el tiempo para el reconocimiento de un objeto nuevo, a la par de una disminución del IRON en los roedores bulbectomizados en comparación de los animales sanos (Yamada y cols., 2011; Le y cols., 2013), indicando así un déficit en la memoria episódica a corto plazo, lo anterior se traduce a la pérdida de la capacidad para discriminar objetos novedosos de los presentados, inicialmente provocado por la aparición de lesiones en las regiones involucradas con el reconocimiento de objetos visuales en la memoria episódica (Antunes y Biala, 2012); Por otro lado nuestros resultados indicaron que el grupo OBX con la administración de la dieta suplementada con aceite de *P. americana* presentó un valor comparable del índice de reconocimiento de objeto nuevo con los grupos control, así como un incremento significativo del IRON con respecto al grupo OBX sin tratamiento (figura 12), por lo tanto se observa una mejoría de la memoria episódica a corto plazo; considerando que uno de los principales componentes terapéuticos del aceite de *P. americana* es la luteína y los AGPI. Los resultados anteriores coinciden con lo reportado por Do Prado y cols., 2017, quienes indicaron que la administración de luteína en una dosis 100 mg por Kg, mejoró

significativamente el IRON en ratones suizo machos; por otro lado, en otro estudio se describió el efecto neuroprotector de la administración de 0.6g/Kg al día de DHA, con lo cual se observó una mejoría del estado cognitivo de ratones 3xTgAD, previniendo la pérdida neuronal de la región de la corteza entorrinal (Arsenault. y cols., 2011).

Los resultados de la evaluación bioquímica complementan la información obtenida a través de las pruebas conductuales; otra de las marcas características de la EA, es la presencia de ovillos neurofibrilares conformados por la acumulación de la proteína tau en su estado hiperfosforilado. En el presente estudio se evaluó mediante la técnica de *western blot* los niveles de proteína tau presentes en los homogenizados de corteza frontal de los diferentes grupos. Los resultados obtenidos indicaron que el grupo OBX sin tratamiento, presentó niveles de la proteína tau total significativamente menores en comparación con los grupos control sin cirugía, lo anterior puede ser atribuido al hecho de que el análisis fue llevado a cabo en muestras que contienen la fracción soluble de la proteína tau, por tanto los animales bulbectomizados presentan una menor proporción de proteína tau soluble que los grupos control, posiblemente asociado con la modificación de hiperfosforilación inducida por bulbectomía, por lo tanto en el tejido de estos roedores se incrementa la formación de cúmulos helicoidales y agregados de proteína tau, los cuales quedan en mayor proporción en las fracciones insolubles de la muestra, por lo que el nivel de proteína tau total, detectado en las fracciones solubles de la muestra fue menor. El resultado anterior es consistente con lo reportado por Li y colaboradores, quienes encontraron que en roedores con bulbectomía olfatoria bilateral se produce una disminución de los niveles de proteína tau en estado no fosforilado en comparación con el grupo sham, en las fracciones solubles de tejido cerebral (Li y cols., 2016). En el presente estudio fue posible encontrar 2 bandas características que corresponden a las isoformas de 64, 69 kDa (Buée y cols., 2000; Sergeant y cols., 1997), las cuales se han identificado en taupatías entre las cuales se encuentra la EA. En cuanto al efecto del aceite de *P.*

americana en los niveles de proteína tau, se observó que no produjo diferencia significativa con respecto al grupo bulbectomizado sin tratamiento, sin embargo, como se observa en la figura 13b, hay una ligera tendencia hacia el incremento en los niveles de tau en el grupo OBX+PA con respecto al grupo OBX. Es posible que un tratamiento más prolongado fuera necesario para inducir un incremento significativo en los niveles de proteína tau total, esta idea se basa en que estudios anteriores han demostrado el efecto positivo ante la exposición al tratamiento durante un periodo más prolongado o con un mayor porcentaje en la suplementación de DHA sobre los niveles de proteína tau total; como lo reportan Arsenault y colaboradores quienes encontraron un incremento significativo en los niveles de proteína tau total soluble en un modelo triple transgénico (3xTg-AD) en un periodo de 10 meses con una dieta alta en AGPI (9.5, 0.5 y 34 $\mu\text{mol/g}$ de DHA, ALA y LA) en comparación con el grupo control; así mismo, se ha encontrado que la administración de carotenoides puede disminuir la hiperfosforilación de la proteína tau y gracias a esto posiblemente puedan observarse los niveles de proteína tau reestablecidos en los animales con procesos neurodegenerativos, tal como lo reportan Gao y colaboradores con la administración de 5 mg diarios licopeno (carotenoide) en ratones transgénicos Tau (que expresan la mutación P301L) (Gao y cols., 2018); otro factor que debe ser considerado es la calidad del alimento base administrado, en nuestro caso utilizamos Nutricubos de la marca purina®, sin embargo existen en el mercado alimentos cuyos estándares de calidad son superiores como LabDiet Rodent 5001, el cual es sugerido para la administración de dietas controladas.

El estrés oxidativo es descrito como un proceso clave en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA, el cuál conduce a alteraciones de las estructuras celulares y procesos metabólicos que inducen la muerte celular. El estrés oxidativo, se caracteriza por el incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno y nítricas que participan en las reacciones de oxidación componentes celulares como proteínas y lípidos. Este proceso de estrés oxidativo

es generado por la disfunción de los componentes de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial y el ciclo de Krebs; dado que la inhibición de las enzimas que conforman la CTE provoca una fuga de electrones de la mitocondria y en consecuencia un incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres (Binawade y Jagtap, 2013). Se ha encontrado que pacientes con deterioro cognitivo leve y con la EA presentan altos niveles de subproductos de oxidación en tejido cerebral a consecuencia del incremento de especies reactivas durante el proceso neurodegenerativo (Rae y Williams, 2017; Saharan y Mandal, 2014), por otro lado en los roedores bulbectomizados se observa un déficit energético por la baja tasa de oxidación del sustrato NADH del complejo I de la CTE, lo que genera una disminución del potencial de membrana y disminuye la actividad del complejo IV (citocromo oxidasa); dichas alteraciones incrementan los niveles de especies reactivas del oxígeno y nítricas generando un proceso de estrés oxidativo, produciendo así el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la disminución de moléculas antioxidantes como el glutatión reducido (Saharan y Mandal, 2014; Gulyaeva y cols., 2017; Thakare y cols., 2017; Bansal y cols., 2018), los cuales son marcadores de estrés oxidativo que evaluamos en el presente trabajo.

El glutatión es un tripéptido que tiene propiedades antioxidantes, se puede encontrar en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos, donde participa en reacciones de reducción de especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno generado en altas proporciones durante el proceso neuroinflamatorio (Rae y Williams, 2017). Cuando el glutatión en su forma reducida (GSH) participa en una reacción de reducción, inmediatamente pasa a su forma oxidada (GSSG), en este estado el glutatión pierde su capacidad reductora y deberá ser reducido nuevamente por acción de la enzima glutatión reductasa que utiliza NADPH. En condiciones normales los tejidos poseen una mayor proporción de la forma reducida, lo cual permite una mayor capacidad antioxidante ante la formación de especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, se considera que el ratio de GSH/GSSG es un parámetro

del estado oxidativo (Saharan y Mandal, 2014). Diversos estudios realizados tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro* de la EA han mostrado que existe una disminución de la proporción de GSH/GSSG consecuencia del incremento de estrés oxidativo (Saharan y Mandal, 2014).

Los niveles de actividad de enzimas antioxidantes son considerados como otros indicadores de estrés oxidativo, como la actividad de la enzima catalasa, que se encuentra ubicada en los organelos celulares, peroxisomas (Marín-García, 2014), cuya función es la reducción de la especie reactiva, peróxido de hidrógeno dando como producto final agua y oxígeno molecular (Santos y cols., 2018) mediante la interacción con el grupo hemo presente en la enzima (Nandi y cols., 2019). En diversos modelos para el estudio de la EA se ha mostrado alteración de la actividad de la enzima catalasa (Gsell y cols., 1995) y se ha propuesto que en la EA el mecanismo que produce la reducción de la actividad enzimática de catalasa es debido a la interacción producida entre el péptido beta amiloide y un dominio específico de la enzima catalasa, interfiriendo así con su actividad antioxidante, a la par del incremento del proceso neuroinflamatorio y la formación de complejos del péptido A β con iones metálicos como el cobre (A β -Cu⁺) que provocan el incremento de la formación de peróxido de hidrógeno, agravando el estado de estrés oxidativo (Nandi y cols., 2019).

En modelos murinos bulbectomizados se ha reportado la reducción de la concentración de GSH y la actividad de CAT después de dos semanas de realizada la cirugía, tanto en homogenizados de hipocampo (Jindal y cols., 2015) como en corteza cerebral (Almeida y cols., 2017; Bansal y cols., 2018; Rinwa y Kumar, 2013). Nuestras observaciones realizadas a las ocho semanas post bulbectomía olfatoria bilateral, mostraron que los niveles de la proporción de GSH/GSSG y la actividad de catalasa se encontraron disminuidos en el grupo de animales OBX en comparación con los grupos control, lo cual puede ser atribuido al incremento en los niveles de estrés oxidativo derivados de la respuesta neuroinflamatoria incrementada que se presenta en el modelo OBX (Song y Leonard, 2005).

En el presente trabajo, se observó que el tratamiento con aceite de *P. americana* en los animales bulbectomizados incrementó la relación GSH/GSSG con respecto al grupo OBX sin tratamiento, así, el tratamiento restableció la relación a niveles semejantes a los observados en el grupo control. Así mismo, se observó un incremento de la actividad enzimática de catalasa en el grupo tratado con aceite de *P.americana* en comparación con el grupo sin tratamiento. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Ortiz-Avila y colaboradores, quienes encontraron que la administración de una dieta suplementada al 10% con aceite de aguacate, en un modelo de ratas diabéticas durante un periodo de 90 días, atenuó el daño mitocondrial, reestableciendo el potencial de membrana y la actividad del complejo III mitocondrial, los niveles de la tasa de oxidación GSH/GSSG, junto con una disminución de EROs y productos de la peroxidación lipídica, disminuyendo así el daño generado por el estrés oxidativo en cerebro (Ortiz- Avila y cols., 2015b); el mismo efecto fue observado en los tejidos de otros órganos como en riñón (Ortiz-Avila y cols., 2017) e hígado (Ortiz- Avila y cols., 2015a). Por otro lado, uno de los principales componentes del aceite de aguacate es el carotenoide luteína, el cual ha mostrado efectos antioxidantes que son atribuidos a sus características estructurales como sus dobles enlaces conjugados y sus dos grupos hidroxilos en sus dos extremos terminales, con lo cual es capaz de estabilizar los radicales libres, disminuyendo el daño por estrés oxidativo. Un estudio posterior demostró que la administración oral de luteína por 14 días en el modelo de ratas con la enfermedad de Huntington (con la administración de ácido 3- nitro propiónico), incrementó los niveles de CAT y restauró la actividad de los complejos enzimáticos (I, II, IV) de la CTE mitocondrial (Binawade y Jagtap, 2013); por otro lado, Al Amin y colaboradores realizaron un estudio en el que se administró durante un periodo de 6 semanas un caroteno que es isómero de la luteína: astaxantina, en un modelo de exposición prenatal a LPS en ratones suizos que genera estrés oxidativo e inflamación; los resultados mostraron que la astaxantina redujo los niveles elevados de MDA, NO y APOP (producto de oxidación proteica avanzado); así como una restauración de la concentración de GSH cerebral (Al Amin y cols., 2016), así mismo, en otro estudio

in vitro se demostró que la administración de astaxantina puede restaurar la actividad enzimática de la SOD y la CAT en la línea celular U937 (Franceschelli y cols., 2014). Así, todos estos resultados son consistentes con los obtenidos en el presente trabajo.

En cuanto a la evaluación de los cambios en la expresión del receptor 5HT_{2c} en corteza frontal, nuestros resultados obtenidos indicaron que no hubo diferencias significativas en la expresión del receptor de serotonina 2C, por lo tanto, el proceso de bulbectomía olfatoria bilateral no produjo alteraciones significativas destacables en la densidad de expresión de este receptor, lo anterior resultó ser opuesto a lo esperado, debido a que el receptor 5HT_{2c} está involucrado con los síntomas psicológicos y conductuales de la demencia, tales como depresión, ansiedad, disminución de ingesta de alimentos y disminución de peso, desórdenes de sueño, alucinaciones visuales y delirios, los cuales se encuentran estrechamente relacionado con los cambios en la expresión del receptor y disminución del efecto modulador del sistema dopaminérgico en la región de la corteza prefrontal en humanos; sin embargo, cabe mencionar que en estudios realizados en animales, los cambios en la expresión del receptor 5HT_{2c} han sido observados en otras regiones del encéfalo (Chakraborty y cols., 2020; Flirski y cols., 2011), lo anterior explicaría la ausencia de alteraciones observadas a nivel de la corteza frontal. Como se describió anteriormente el proceso de bulbectomía olfatoria bilateral genera alteraciones en el sistema serotoninérgico como consecuencia de la degeneración de fibras serotoninérgicas que van desde las estructuras olfatorias, lo que a su vez produce alteraciones en el núcleo dorsal del rafe (Gulyaeva y cols., 2017; Oba y cols., 2013); sin embargo, a la fecha se conoce poca información acerca de los niveles de expresión del receptor 5HT_{2c} en roedores bulbectomizados. En general, se ha encontrado en tejido *post-mortem* de corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos que la densidad de receptor 5HT_{2c} se encuentra reducida (Oba y cols., 2013), lo cual es consistente con la tendencia observada en nuestros resultados, esta disminución en la expresión del receptor puede ser consecuencia

del mecanismo compensatorio que ocurre a raíz del incremento en los niveles de serotonina que se han rastreado en ratas bulbectomizadas principalmente en la corteza frontal y parietal (Watanabe y cols., 2003); sin embargo cabe mencionar que se ha detectado una hipersensibilidad de los receptores 2A y 2C en roedores OBX (Oba y cols., 2013), la cual podría no está precisamente relacionada a las alteraciones producidas en la corteza frontal, sino en otras regiones como la amígdala.

Dirección General de Bibliotecas UAG

10. CONCLUSIÓN

El modelo de bulbectomía olfatoria bilateral indujo alteraciones a nivel conductual como el déficit en la memoria de trabajo y en la memoria episódica, ambas a corto plazo, sin embargo, no se observaron alteraciones en la memoria a largo plazo, con lo cual fue posible observar un efecto positivo del aceite de *P. americana* sobre el estado de la memoria episódica, en correlación con los parámetros bioquímicos evaluados, como la proporción de GSH/GSSG y la actividad de la enzima catalasa, lo cual indica que los componentes presentes en el aceite de *P. americana* favorecieron la disminución del estrés oxidativo presentado en los roedores bulbectomizados; por otro, lado los niveles proteína tau total no mostraron cambios significativos tras las 18 semanas de suplementación con aceite de *P. americana*. Así mismo, no observaron cambios importantes en la expresión del receptor 5HT_{2C} en corteza frontal en el modelo OBX con respecto a los grupos control, por lo tanto, no fue posible determinar si la suplementación con aceite de *P. americana* produjo algún cambio en la expresión del receptor 5HT_{2C} en corteza frontal. Los resultados sugieren la importancia de evaluar otras estructuras del sistema nervioso relacionadas con la EA (hipocampo y corteza entorrinal); además sería adecuado complementar con la evaluación de otros parámetros como la presencia de placas beta amiloide por la técnica de inmunohistoquímica para conocer el efecto del aceite de *P. americana* sobre la amiloidosis, la evaluación de astrogliosis y microgliosis, así como sobre la taupatía de las áreas cerebrales afectadas mediante el empleo de anticuerpos dirigidos a los cúmulos helicoidales de tau.

11. REFERENCIAS

- Able, A., Liu, Y., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P. y McNamara, R. K. (2014).** Omega-3 fatty acid deficient male rats exhibit abnormal behavioral activation in the forced swim test following chronic fluoxetine treatment: Association with altered 5-HT1A and alpha2A adrenergic receptor expression. *Journal of Psychiatric Research*, 50(1), 42–50.
- Acosta, I., Sosa, A., Orozco, R. y Borges, G. (2012).** Síntomas neuropsiquiátricos en adultos mayores con demencia y su relación con la severidad de la enfermedad. *Revista de investigación clínica; órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*. 2012; 64(4):354-63.
- Al-Amin, M. M., Sultana, R., Sultana, S., Rahman, M. M., y Reza, H. M. (2016).** Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. *BMC Neuroscience*, 17(1), 1–10.
- Aljanabi, N. M., Mamtani, S., Al-Ghuraibawi, M., Yadav, S., y Nasr, L. (2020).** Alzheimer's and Hyperglycemia: Role of the Insulin Signaling Pathway and GSK-3 Inhibition in Paving a Path to Dementia. *Cureus*, 12(2), e6885.
- Almeida, R. F. de, Ganzella, M., Machado, D. G., Loureiro, S. O., Leffa, D., Quincozes-Santos, A., Pettenuzzo, L. F., Duarte, M., Duarte, T. y Souza, D. O. (2017).** Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 76, 1–11.
- Alzheimer's Association, Alzheimer's Association Report 2020.** Alzheimer's disease facts and figures. 2020. *Alzheimer's & Dementia*, 16(3), 391–460.
- Alzheimer's Association, Alzheimer's Association Report. (2018).** 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*; 14(3), 367–429.

- Antunes, M. y Biala, G. (2012).** The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110.
- Arsenault, D., Julien, C., Tremblay, C., & Calon, F. (2011).** DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS ONE*, 6(2).
- Assal, F., Alarcón, M., Solomon, E. C., Masterman, D., Geschwind, D. H. y Cummings, J. L. (2004).** Association of the serotonin transporter and receptor gene polymorphisms in neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 61(8), 1249–1253.
- Avetisyan, A.V., Samokhin, A.N., Alexandrova, I.Y., Zinovkin, R.A., Simonyan, R.A. y Bobkova, N.V. (2016).** Mitochondrial Dysfunction in Neocortex and Hippocampus of Olfactory Bulbectomized Mice, a Model of Alzheimer's Disease. *Biochemistry (Moscú)*. 81(6):615-23.
- Bansal, Y., Singh, R., Saroj, P., Sodhi, R. K. y Kuhad, A. (2018).** Naringenin protects against oxido-inflammatory aberrations and altered tryptophan metabolism in olfactory bulbectomized-mice model of depression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 355, 257–268.
- Bastin C, Bahri M A, Meyer F, Manard M, Delhaye E, Plenevaux A, Becker G, Seret A, Mella C, Giacomelli F, Degueldre C, Balteau E, Luxen A, Salmon, E. 2020.** In vivo imaging of synaptic loss in Alzheimer's disease with [18F]UCB-H positron emission tomography. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 47(2):390–402.
- Batarseh, Y. S., y Kaddoumi, A. (2018).** Oleocanthal-rich extra-virgin olive oil enhances donepezil effect by reducing amyloid- β load and related toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 55, 113–123.

- Bazinet, R.P.** y Laye, S., (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 771-785.
- Begdache, L.** (2018). The Serotonergic System in Diet, Obesity and Mental Health. *Global Journal of Endocrinological Metabolism*, 1(5), 1–7.
- Berger, E.,** Smesny, S., Davey, C., Rice, S., Sarnyai, Z., Schlögelhofer, M., Schäfer, M., Berk, M., McGorry, P. y Amminger, G. (2017). Omega-6 to omega-3 polyunsaturated fatty acid ratio and subsequent mood disorders in young people with at-risk mental states: a 7-year longitudinal study. *Translational Psychiatry*. 7: e1220.
- Bertram, L.,** y Tanzi, R. E. (2019). Alzheimer disease risk genes: 29 and counting. *Nature Reviews Neurology*.
- Binawade, Y.** y Jagtap, A. (2013). Neuroprotective effect of lutein against 3-nitropropionic acid-induced huntington's disease-like symptoms: Possible behavioral, biochemical, and cellular alterations. *Journal of Medicinal Food*, 16(10), 934–943.
- Broadbent, N. J.,** Squire, L. R., y Clark, R. E. (2004). *Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14515–14520.
- Buée, L.,** Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A. y Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 33(1), 95–130.
- Campos, M.,** Edland, S. y Peavy, G. (2013). An Exploratory Study of APOE-ε4 Genotype and Risk of Alzheimer's Disease in Mexican Hispanics. *Journal of the American Geriatrics Society*. 61(6): 1038–1040.
- Cao, Y.,** Qian, L., Yu, W., Li, T., Mao, S., Han, G. (2020). Donepezil plus memantine versus donepezil alone for treatment of concomitant Alzheimer's disease and

chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective observational study. *Journal of International Medical Research*. 48(2).

Carhart-Harris, R. L. y Nutt, D. J. (2017). Serotonin and brain function: A tale of two receptors. *Journal of Psychopharmacology*, 31(9), 1091–1120.

Chakrabarti, S., Kumar, V., Banerjee, A., Chatterjee, G., Ganguly, A. y Biswas, A. (2015) Metabolic Risk Factors of Sporadic Alzheimer's Disease: Implications in the Pathology. Pathogenesis and Treatment. *Aging and Disease*. 6 (4):282-99.

Chakraborty, S., Lennon, J. C., Malkaram, S. A., Zeng, Y., Fisher, D. W., Dong, H. y Sciences, B. (2020). *disease*. 3433, 36–44.

Che, H., Li, Q., Zhang, T., Wang, D., Yang, L., Xu, J., Yanagita, T., Xue, C., Chang, Y. y Wang, Y. (2018). Effects of Astaxanthin and Docosahexaenoic-Acid-Acylated Astaxanthin on Alzheimer's Disease in APP/PS1 Double-Transgenic Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19), 4948–4957.

Chen XQ, Mobley WC. (2019). Alzheimer disease pathogenesis: Insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A β and tau species. *Frontiers of Neurosciences*. 13: 1–21.

Chu D. Liu F. 2019. Pathological changes of tau related to Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 10(2).

Clemett, D. A., Punhani, T., Duxon, M. S., Blackburn, T. P. y Fone, K. C. F. (2000). Immunohistochemical localization of the 5-HT(2C) receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology*, 39(1), 123–132.

De la Rubia Ortí, J. E., García-Pardo, M. P., Drehmer, E., Sancho Cantus, D., Julián Rochina, M., Aguilar, M. A., & Hu Yang, I. (2018). Improvement of Main Cognitive Functions in Patients with Alzheimer's Disease after Treatment with

Coconut Oil Enriched Mediterranean Diet: A Pilot Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 65(2), 577–587.

Del Toro-Equihua, M., Velasco-Rodríguez, R., López-Ascencio, R., y Vásquez, C. (2016). Effect of an avocado oil-enhanced diet (*Persea americana*) on sucrose-induced insulin resistance in Wistar rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(2), 350–357.

Dickerson, B. C., y Eichenbaum, H. (2009). *The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders*. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 86–104.

do Prado Silva, J. T., Geiss, J. M. T., Oliveira, S. M., Brum, E. da S., Sagae, S. C., Becker, D., Leimann, F. V., Ineu, R. P., Guerra, G. P. y Gonçalves, O. H. (2017). Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. *Materials Science and Engineering C*, 76, 1005–1011.

Dong, S., Huang, X., Zhen, J., Van Halm-Lutterodt, N., Wang, J., Zhou, C. e Yuan, L. (2018). Dietary Vitamin E Status Dictates Oxidative Stress Outcomes by Modulating Effects of Fish Oil Supplementation in Alzheimer Disease Model APP_{Swe}/PS1_{dE9} Mice. *Molecular Neurobiology*. 55(12):9204-9219.

Dreher, M.L. y Davenport, A.J. (2013). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 53(7):738-50.

Dubey, S. K., Lakshmi, K. K., Krishna, K. V., Agrawal, M., Singhvi, G., Saha, R. N., Saraf S., Saraf S., Shukla R. y Alexander, A. (2020). Insulin mediated novel therapies for the treatment of Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 117540.

Dubois B., Feldman H., Jacova C., Hampel H., Molinuevo J., Blennow K., DeKosky S., Gauthier S., Selkoe D., Bateman R., Cappa S., Crutch, Engelborghs S., Frisoni G., Fox N., Galasko D., Habert M., Jicha G., Nordberg A., Pasquier F., Rabinovici G., Robert P., Rowe C., Salloway S., Sarazin M., Epelbaum S., de Souza L., Vellas B., Visser P., Schneider L., Stern Y., Scheltens P. y Cummings J. (2016). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *The Lancet Neurology*. 13(6):614-29.

- Dudchenko, P. A. (2004).** An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(7), 699–709.
- Engelborghs, S. y Le Bastard, N. (2012).** The role of CSF biomarkers in the diagnostic work-up of mixed vascular-degenerative dementia. *Journal of Neurology Science*. 322(1-2):197.
- Fan, C., Liu, X., Shen, W., Deckelbaum, R. J., y Qi, K. (2011).** The Regulation of Leptin, Leptin Receptor and Pro-opiomelanocortin Expression by N-3 PUFAs in Diet-Induced Obese Mice Is Not Related to the Methylation of Their Promoters. *Nutrition & Metabolism*, 8(1), 31.
- Fernando, W.M., Martins, I.J., Goozee, K.G., Brennan, C., Jayasena, V. y Martins, R.N. (2015).** The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *British Journal of Nutrition*. 114(1):1-14.
- Flirski, M., Sobow, T. y Kloszewska, I. (2011).** Behavioural genetics of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *Archives of Medical Science*, 7(2), 195–210.
- Fongang, B., Cunningham, K. A., Rowicka, M. y Kudlicki, A. (2019).** Coevolution of Residues Provides Evidence of a Functional Heterodimer of 5-HT_{2A}R and 5-HT_{2C}R Involving Both Intracellular and Extracellular Domains. *Neuroscience*, 412, 48–59.
- Forlenza, O. V., Radanovic, M., Talib, L. L., Aprahamian, I., Diniz, B. S., Zetterberg, H. y Gattaz, W. F. (2015).** Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 1(4), 455–463.
- Franceschelli, S., Pesce, M., Ferrone, A., De Lutiis, M. A., Patruno, A., Grilli, A., Felaco, M. y Speranza, L. (2014).** Astaxanthin treatment confers protection against oxidative stress in U937 cells stimulated with lipopolysaccharide

reducing O₂- production. *PLoS ONE*, 9(2), 1–9.

Franks, K., Inn Chuah, M., King, A. y Vickers, J. (2015). Connectivity of Pathology: The Olfactory System as a Model for Network-Driven Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Frontiers Aging Neuroscience*. 7: 234.

Gao Y, Tan L, Yu JT, Tan L. 2018. Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Current Alzheimer Research*. 15(3): 283–300.

Gaurav, P. y Ross- Watson R. (2014). Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health. Cap 19: Effects of Omega-3 Fatty Acids on Alzheimer's disease. Ed. Elsevier. 19: 231-235.

Graeber, M. B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. 111–122.

Gsell, W., Conrad, R., Hicketier, M., Sofic, E., Frölich, L., Wichart, I., Jellinger, K., Moll, G., Ransmayr, G., Beckmann, H., y Riederer, P. (1995). Decreased Catalase Activity but Unchanged Superoxide Dismutase Activity in Brains of Patients with Dementia of Alzheimer Type. *Journal of Neurochemistry*, 64(3), 1216–1223.

Guerreiro, R., & Bras, J. (2015). The age factor in Alzheimer's disease. *Genome medicine*, 7, 106.

Gulyaeva, V., Bobkova, V., Kolosova, G., Samokhin, N., Stepanichev, Y. y Stefanova, A. (2017). Molecular and Cellular Mechanisms of Sporadic Alzheimer's Disease: Studies on Rodent Models *in vivo*. *Biochemistry* (Moscu). 82(10):1088-1102.

Gutiérrez-Robledo, L. y Arrieta-Cruz, I. (2015). Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer's Plan. Instituto Nacional de Geriátria en México. *Gaceta Médica en México*. 151:620-5.

- Heras- Sandoval, D., Pedraza Chaverri, J. y Pérez Rojas J. (2016).** Role of docosaehaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. (13): 61.
- Holmes, C., Arranz, M., Collier, D., Powell, J. y Lovestone, S. (2003).** Depression in Alzheimer's disease: The effect of serotonin receptor gene variation. *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics*, 119 B(1).
- Hu, J., Wang, X., Liu, D., Wang, Q. y Zhu, L. (2012).** Olfactory deficits induce neurofilament hyperphosphorylation. *Neuroscience Letters*. 506: 180–183.
- Huang, L.K., Chao, S.P., Hu, C.J. (2020).** Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *Journal of Biomedical Science*. 27(1): 1–13.
- Jack, C., Bennett, D., Blennow, K., Carrillo, M., Dunn, B. y Haeblerlein, S. (2018).** NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 14(4), 535–562.
- Jindal, A., Mahesh, R. y Bhatt, S. (2015).** Etazolate, a phosphodiesterase-4 enzyme inhibitor produces antidepressant-like effects by blocking the behavioral, biochemical, neurobiological deficits and histological abnormalities in hippocampus region caused by olfactory bulbectomy. *Psychopharmacology*, 232(3), 623–637.
- Kalshetti, P. B., Alluri, R. y Thakurdesai, P. A. (2015).** Antidepressant effects of standardized extract of Commiphora mukul Engl. in olfactory bulbectomized rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(1), 41–48.
- Kim, H. (2019).** Neural activity during working memory encoding, maintenance, and retrieval: A network-based model and meta-analysis. *Human Brain Mapping*, 40(17), 4912–4933.

- Kivipelto**, M., Mangialasche, F. y Ngandu, T. (2018). Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*.
- Klimova**, B., Novotný, M., Kuca, K., & Valis, M. (2019). Effect Of An Extra-Virgin Olive Oil Intake On The Delay Of Cognitive Decline: Role Of Secoiridoid Oleuropein?. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Volume 15, 3033–3040.
- Kundu** D, Prerna K, Chaurasia R, Bharty MK, Dubey VK. 2020. Advances in protein misfolding, amyloidosis and its correlation with human diseases. 3 *Biotechnology journal*. 10(5): 1–22.
- Lacombe**, R., Giuliano, V., Colombo, S.M., Arts, M.T. y Bazinet, R.P., (2017). Compound-specific isotope analysis resolves the dietary origin of docosahexaenoic acid in the mouse brain. *Journal of Lipid Research* 58, 2071-2081.
- Lauretti**, E., y Praticò, D. (2017). Effect of canola oil consumption on memory, synapse and neuropathology in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(1).
- Laye**, S., Nadjar, A., Joffre, C. y Bazinet, R.P., (2018). Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology. *Pharmacological Reviews* 70, 12-38.
- Lazarov**, O., y Hollands, C. (2016). Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Progress in Neurobiology*, 138-140, 1–18.
- Le**, X. T., Pham, H. T. N., Do, P. T., Fujiwara, H., Tanaka, K., Li, F., Van Nguyen, T., Nguyen, K. M. y Matsumoto, K. (2013). Bacopa monnieri ameliorates memory deficits in olfactory bulbectomized mice: Possible involvement of glutamatergic and cholinergic systems. *Neurochemical Research*, 38(10), 2201–2215.

- Lee, H.J., Seo, H.I., Cha, H.Y., Yang, Y.J., Kwon, S.H. y Yang, S.J. (2018).** Diabetes and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Nutritional Aspects. *Clinical nutrition research*, 7 (4), 229–240.
- Li, K., Liu, F. F., He, C. X., Huang, H. Z., Xie, A. J., Hu, F., Liu, D., Wang, J. Z. y Zhu, L. Q. (2016).** Olfactory Deprivation Hastens Alzheimer-Like Pathologies in a Human Tau-Overexpressed Mouse Model via Activation of cdk5. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 391–401.
- Liu, C., Kanekiyo, T., Xu, H. y Bu, G. (2013).** Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews. Neurology*. 9(2):106-18.
- Llorens-Martin, M., Jurado, J., Hernández, F., y Ávila, J. (2014).** GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*,7(46): 1-11.
- Maloney B, Lahiri DK. 2016.** Epigenetics of dementia: understanding the disease as a transformation rather than a state. *The Lancet Neurology*. 15(7): 760–774.
- Marcus, C., Mena, E. y Subramaniam, R. (2014).** Brain PET in the Diagnosis of Alzheimer's disease. *Clinical Nuclear Medicine*. 39(10): 413–426.
- Marín-García, J. (2014).** Oxidative Stress and Cell Death in Cardiovascular Disease. *Post-Genomic Cardiology*, 471–498.
- Martins, L. C. A., Rocha, N. P., Torres, K. C. L., dos Santos, R. R., França, G. S., de Moraes, E. N., Mukhamedyarov, M. A., Zefirov, A. L., Rizvanov, A. A., Kiyasov, A. P., Vieira, L. B., Guimaraes, M. M., Yalvaç, M. E., Teixeira, A. L., Bicalho, M. A. C., Janka, Z., Romano-Silva, M. A., Palotás, A. y Reis, H. J. (2012).** Disease-specific expression of the serotonin-receptor 5-HT_{2C} in natural killer cells in Alzheimer's dementia. *Journal of Neuroimmunology*, 251(1–2), 73–79.

- Masters, C.,** Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C., Sperling, R. y Cummings, L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 1: 15056.
- Mehta, K. y** Yeo, G. (2017). Systematic review of dementia prevalence and incidence in United States race/ethnic populations. *Alzheimer's & Dementia*. 13(1): 72–83.
- Mejía-Arango S.,** López-Ortega M., Barba-Ramírez L. (2020) Tratamientos conductuales y psicosociales de la demencia en México. En: Adames H., Tazeau Y. (eds) Cuidando a los latinxs con demencia en un mundo globalizado. New York: Springer Nature, vol.1:267-277.
- Mendiola-Precoma, J.,** Berumen, L., Padilla, K. y Garcia-Alcocer, G. (2016). Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. 1–17.
- Mendiola-Precoma, J.,** Padilla, K., Rodríguez-Cruz, A., Berumen, L.C., Miledi, R. y García-Alcocer, G. (2017). Theobromine-Induced Changes in A1 Purinergic Receptor Gene Expression and Distribution in a Rat Brain Alzheimer's Disease Model. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*. 55(3):1273-1283.
- Millan, M. J. (2005).** Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Thérapie*, 60(5), 441–460.
- Morales-Medina, J. C.,** Iannitti, T., Freeman, A., y Caldwell, H. K. (2017). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: The hippocampal pathway. *Behavioural Brain Research*, 317, 562–575.
- Nandi, A.,** Yan, L. J., Jana, C. K. y Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

- Nebuka, M., Ohmura, Y., Izawa, S., Bouchekioua, Y., Nishitani, N., Yoshida, T. y Yoshioka, M. (2020).** Behavioral characteristics of 5-HT_{2C} receptor knockout mice: Locomotor activity, anxiety-, and fear memory-related behaviors. *behavioral Brain Research*, 379(11), 112394.
- Nyberg, L., McIntosh, A. R., Houle, S., Nilsson, L. G. y Tulving, E. (1996).** Activation of medial temporal structures during episodic memory retrieval. En *Nature* (Vol. 380, Número 6576, pp. 715–717).
- Oba, A., Nakagawasai, O., Onogi, H., Nemoto, W., Yaoita, F., Arai, Y., Tan-No, K. y Tadano, T. (2013).** Chronic fluvoxamine treatment changes 5-HT_{2A/2C} receptor-mediated behavior in olfactory bulbectomized mice. *Life Sciences*, 92(2), 119–124.
- Ortiz-Ávila O., Gallegos-Corona M.A., Sánchez-Briones L.A., Calderón-Cortés E., Montoya-Pérez R., Rodríguez-Orozco A.R., Campos-García J., Saavedra-Molina A., Mejía-Zepeda R. y Cortés-Rojo C. (2015a).** Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 47(4):337-53.
- Ortiz-Ávila, O., Esquivel-Martínez, M., Olmos-Orizaba, B., Saavedra-Molina, A., Rodríguez-Orozco, A. y Cortés-Rojo C. (2015b).** Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*. 9.
- Ortiz-Avila, O., Figueroa-García, M. del C., García-Berumen, C. I., Calderón-Cortés, E., Mejía-Barajas, J. A., Rodríguez-Orozco, A. R., Mejía-Zepeda, R., Saavedra-Molina, A. y Cortés-Rojo, C. (2017).** Avocado oil induces long-term alleviation of oxidative damage in kidney mitochondria from type 2 diabetic rats by improving glutathione status. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49(2), 205–214.
- Pilar-Cuellar, F., Castro, E., Bretin, S., Mocaer, E., Pazos, Á., y Díaz, Á. (2019).** S

47445 counteracts the behavioral manifestations and hippocampal neuroplasticity changes in bulbectomized mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 93(December 2018), 205–213.

- Primeaux**, S., Barnes, M., y Bray, G. (2007). Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behavioral Brain Research*, 180(2), 190–196.
- Pudell**, C., Vicente, B.A., Delattre, A.M., Carabelli, B., Mori, M.A., Suchecki, D., Machado, R.B., Zanata, S.M., Visentainer J.V., de Oliveira Santos Junior, O., Lima, M. y Ferraz, C. (2014) Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomized rats. *European Journal of Neuroscience*. 39(2):266-74.
- Rae**, C. D. y Williams, S. R. (2017). Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 529, 127–143.
- Raefsky**, S.M., Furman, R., Milne, G., Pollock, E., Axelsen, P., Mattson, M.P. y Shchepinov, M.S. (2018). Deuterated polyunsaturated fatty acids reduce brain lipid peroxidation and hippocampal amyloid β -peptide levels, without discernable behavioral effects in an APP/PS1 mutant transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 66:165-176.
- Redrobe**, J. P., Bull, S. y Plath, N. (2010). Translational aspects of the novel object recognition task in rats abstinent following sub-chronic treatment with phencyclidine (PCP): Effects of modafinil and relevance to cognitive deficits in schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 1(NOV), 1–7.
- Rey**, C., Delpéch, J.C., Madore, C., Nadjar, A., Greenhalgh, A.D., Amadiéu, C., Aubert, A., Pallet, V., Vaysse, C., Layé, S. y Joffre, C., (2018). Dietary n-3 long chain PUFA supplementation promotes a proresolving oxylipin profile in the brain, *Brain, Behavior, and Immunity*. 76:17-27.

- Richter**, S. H., Zeuch, B., Lankisch, K., Gass, P., Durstewitz, D. y Vollmayr, B. (2013). Where Have I Been? Where Should I Go? Spatial Working Memory on a Radial Arm Maze in a Rat Model of Depression. *PLoS ONE*, 8(4).
- Rinwa**, P. y Kumar, A. (2013). Quercetin suppress microglial neuroinflammatory response and induce antidepressant-like effect in olfactory bulbectomized rats. *Neuroscience*, 255, 86–98.
- Rodríguez**, J.J., Noristani, H.N. y Verkhatsky, A. (2012). The serotonergic system in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 99 (1), 15–41.
- Rodríguez-Cruz**, M., Tovar, A. R., Del Prado, M. y Torres, N. (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de investigación clínica*, 57(3), 457-472. Recuperado en 25 de marzo de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000300010&lng=es&tlng=es.
- Rubino**, S.J., Mayo, L., Wimmer, I., Siedler, V., Brunner, F., Hametner, S., Madi, A., Lanser, A., Moreira, T., Donnelly, D., Cox, L., Machado, R., Butovsky, O. y Weiner, H.L. (2018). Acute microglia ablation induces neurodegeneration in the somatosensory system. *Nature Communications*, 9 (1).
- Saharan**, S. y Mandal, P. K. (2014). The emerging role of glutathione in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 40(3), 519–529.
- Santana**, N. y Artigas, F. (2017). Expression of Serotonin 2C Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of Rat Prefrontal Cortex: A Comparison with Striatum. *Cerebral Cortex*, 27(6), 3125–3139.
- Santos**, D., Vieira, R., Luzio, A. y Félix, L. (2018). Zebrafish Early Life Stages for Toxicological Screening: Insights From Molecular and Biochemical Markers. *Advances in Molecular Toxicology*, 12, 151–179.

- Sargent**, P. A., Sharpley, A. L., Williams, C., Goodall, E. M. y Cowen, P. J. (1997). 5-HT(2C) receptor activation decreases appetite and body weight in obese subjects. *Psychopharmacology*, 133(3), 309–312.
- Sergeant**, N., David, J. P., Lefranc, D., Vermersch, P., Watzet, A. y Delacourte, A. (1997). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Letters*, 412(3), 578–582.
- Serra** L, Bozzali M, Fadda, L., De Simone MS, Bruschini M, Perri R, Caltagirone C, Carlesimo GA. 2020. The role of hippocampus in the retrieval of autobiographical memories in patients with amnesic Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's disease. *Journal of Neuropsychology*. 14(1): 46–68.
- Sharma**, H.S., Muresanu, D., Castellani, R., Nozari, A., Lafuente, J., Tian, Z. y Sharma, A. (2019). Nanowired delivery of cerebrolysin with neprilysin and p-Tau antibodies induces superior neuroprotection in Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, 145–200.
- Sherwood** Lauralee (2016), Human Physiology: from cells to systems, editorial Cengage Learning, USA, 9ª edición, Págs. 157-162 ISBN: 978-1-285-86693-2.
- Sithisarn**, P., Rojsanga, P., Jarikasem, S., Tanaka, K. y Matsumoto, K. (2013). Ameliorative effects of *acanthopanax trifoliatum* on cognitive and emotional deficits in olfactory bulbectomized mice: An animal model of depression and cognitive deficits. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Solfrizzi**, V., Custodero, C., Lozupone, M., Imbimbo, B.P., Valiani, V., Agosti, P., Schilardi, A., D'Introno, A., La Montagna, M., Calvani, M., Guerra, V., Sardone, R., Abbrescia, D., Bellomo, A., Greco, A., Daniele, A., Seripa, D., Logroscino, G., Sabbá, C. y Panza F. (2017). Relationships of Dietary

Patterns, Foods, and Micro- and Macronutrients with Alzheimer's Disease and Late-Life Cognitive Disorders: A Systematic Review. *Journal of Alzheimer's Disease*. 59(3):815-849.

Song, C. y Leonard, B. E. (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4–5), 627–647.

Squire, L. R., y Dede, A. J. O. (2015). *Conscious and Unconscious Memory Systems*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(3), a021667.

Squire, L. R., y Zola, S. M. (1996). *Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13515–13522.

Sun, X., Chen, W. y Wang, Y. (2015). β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*. 6: 221.

Takahashi, K., Nakagawasai, O., Nemoto, W., Odaira, T., Sakuma, W. y Tan-No, K. (2018). Antidepressant-like effect of aripiprazole via 5-HT_{1A}, D₁, and D₂ receptors in the prefrontal cortex of olfactory bulbectomized mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(3), 241–247.

Takashima A, Wolozin B, Buee L. 2019. *Tau Biology*. Advances in experimental medicine and biology. 1a. edición. Singapore: Springer Nature Singapore, vol.1184:23-35, 217-230.

Takatori, S., Wang, W., Iguchi, A., y Tomita, T. (2019). Genetic Risk Factors for Alzheimer Disease: Emerging Roles of Microglia in Disease Pathomechanisms. *Reviews on Biomarker Studies in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders*, 83–116.

Thakare, V. N., Aswar, M. K., Kulkarni, Y. P., Patil, R. R. y Patel, B. M. (2017). Silymarin ameliorates experimentally induced depressive like behavior in rats: Involvement of hippocampal BDNF signaling, inflammatory cytokines and

oxidative stress response. *Physiology and Behavior*, 179, 401–410.

- Ukropec**, J., Reseland, J. E., Gasperikova, D., Demcakova, E., Madsen, L., Berge, R. K., Rustanc, A.C., Klimesa, I., Drevonb, C.A. y Sebökova, E. (2003). *The hypotriglyceridemic effect of dietary n–3 FA is associated with increased β -oxidation and reduced leptin expression. *Lipids*, 38(10), 1023–1029.*
- Van Cauwenberghe**, C., Van Broeckhoven, C. y Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine: official journal of the American college of Medical Genetics*. 18(5):421-30.
- Wang Y.** y Wang K. (2016). Therapeutic approaches to Alzheimer’s disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20 (11): 2389-2403.
- Wang**, J., Gu, B., Masters, C., y Wang, Y. (2017). A systemic view of Alzheimer disease — insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology*, 13(10), 612–623.
- Watanabe**, A., Tohyama, Y., Nguyen, K. Q., Hasegawa, S., Debonnel, G. y Diksic, M. (2003). Regional brain serotonin synthesis is increased in the olfactory bulbectomy rat model of depression: An autoradiographic study. *Journal of Neurochemistry*, 85(2), 469–475.
- Webers** A, Heneka MT, Gleeson PA. 2020. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer’s disease. *Immunology and Cell Biology*. 98 (1).
- Wolters**, E., Ossenkoppele, R., Verfaillie, S.C.J., Coomans, E.M., Timmers, T., Visser, D., Tuncel, H., Golla, S.S.V., Windhorst, A.D., Boellaard, R., van der Flier, W.M., Teunissen, C.E., Scheltens, P., Van Berckel, B.N.M. (2020). Regional [18F]flortaucipir PET is more closely associated with disease

severity than CSF p-tau in Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*.

World Health Organization (WHO). (2019) Dementia. Página electrónica: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

Xekardaki, A., Kövari, E., Gold, G., Papadimitropoulou, A., Giacobini, E., Herrmann, F., Giannakopoulos, P. y Bouras, C. (2015). Neuropathological Changes in Aging Brain. *Adv Exp Med Biol*.821:11-7.

Yamada, M., Hayashida, M., Zhao, Q., Shibahara, N., Tanaka, K., Miyata, T., & Matsumoto, K. (2011). Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(3), 737–746.

Yan, L., Xie, Y., Kumaran Satyanarayanan, S., Zeng, H., Liu, Q., Huang, M., Ma, Y., Wan, J., Yao, X., Su, K. y Su, H. (2019). Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote brain-to-blood clearance of β - Amyloid in a mouse model with Alzheimer's disease. *Cerebro, comportamiento e inmunidad*.

Yassine, H., Braskie, M., Mack, W., Castor, K., Fonteh, A., Schneider, L., Harrington, M. y Chui, H. (2017). Association of Docosahexaenoic Acid Supplementation With Alzheimer Disease Stage in Apolipoprotein E ϵ 4 Carriers: A Review. *JAMA neurology*, 74(3), 339–347.

Yehuda S. (2012). Polyunsaturated fatty acids as putative cognitive enhancers. *Medical Hypotheses*. 79:456–461.

Yehuda, S. y Rabinovitz, S. (2015). Fatty acids rehabilitated long-term neurodegenerative: like symptoms in olfactory bulbectomized rats. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*. 122(5):629-41.

Yu, Y., Wu, Y., Patch, C., Wu, Z., Szabo, A., Li, D., y Huang, X.-F. (2013). DHA prevents altered 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, CB1 and GABA_A receptor binding

densities in the brain of male rats fed a high-saturated-fat diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(7), 1349–1358.

Zhao N, Liu CC, Qiao W, Bu G. (2018). Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*. 83: 347–357.

Dirección General de Bibliotecas UAQ