

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – UNIDAD IZTAPALAPA



“Asociación entre el déficit colinérgico, las disfunciones de la memoria y el metabolismo energético en un modelo de rata”

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental**

P R E S E N T A

Biol. Exp. Rebeca Martínez Quezada

Comité Tutorial:

Co-director: Dr. José Luis Gómez Olivares

Co-director: Dr. Emilio Domínguez Salazar

Asesora: Dra. Victoria Campos Peña

México D.F., Diciembre, 2013

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 265208

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Asociación entre el déficit colinérgico, las disfunciones de la memoria y el metabolismo energético en un modelo de rata", que presentó

Rebeca Martínez Quezada

El día 3 de diciembre del año 2013

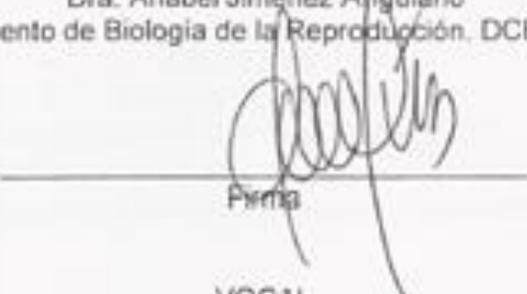
PRESIDENTE
Dr. Héctor Fernando Serrano
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-I


Firma

SECRETARIO
Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología. IFC. UNAM


Firma

VOCAL
Dra. Anabel Jiménez Anguiano
Departamento de Biología de la Reproducción. DCBS. UAM-I


Firma

VOCAL
Dr. Noé Salinas Arreortua
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-I


Firma

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular "C"

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo electrónico: gool@xanum.uam.mx

CO-DIRECTOR

Dr. Emilio Domínguez Salazar

Profesor Titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo electrónico: emidosa@gmail.com

ASESORA

Dra. Victoria Campos Peña

Investigador en Ciencias Médicas "C"

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Correo electrónico: neurovcp@ymail.com

RESUMEN

El aumento en la expectativa de vida ha tenido implicaciones importantes para los sistemas de salud en el ámbito mundial. Con ello se han incrementado las enfermedades asociadas con la edad, entre las que el deterioro cognitivo representa una condición que afecta de manera directa la calidad de vida de la población adulta de la tercera edad. Adicionalmente, el deterioro cognitivo sin demencia constituye una condición de alto riesgo para la aparición de demencias, como la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, algunas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, han mostrado una fuerte relación con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, por sus efectos directos o indirectos en el cerebro.

La funcionalidad de ciertas enzimas puede verse afectada bajo condiciones patológicas, tal como sucede en la enfermedad de Alzheimer y en la diabetes mellitus. Este es el caso de las colinesterasas. Así, por ejemplo, se ha detectado una elevada actividad colinesterásica en las placas neuríticas y en las marañas neurofibrilares características de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, que podrían relacionarse con la agregación amiloide. Se ha reportado que la actividad de las colinesterasas, también aumenta en pacientes diabéticos, en cuyo caso, estas enzimas podrían participar modificando factores de riesgo como la resistencia a la insulina.

Además, se han postulado una gran variedad de mecanismos que pueden tener un papel fisiopatogénico común en el desarrollo de desórdenes metabólicos y

trastornos cognitivos, pudiendo ser las colinesterasas un vínculo entre ambas condiciones.

El objetivo de este trabajo fue establecer la asociación entre el déficit colinérgico, las disfunciones de la memoria y el metabolismo energético, generando un modelo que simulara deterioro cognitivo. Los animales de estudio fueron alimentados con una dieta normal o alta en grasas, según el caso, y se evaluó la capacidad cognitiva, parámetros bioquímicos tales como el perfil lipídico y la actividad de transaminasas, así como la actividad y glicosilación de las colinesterasas.

Los resultados obtenidos evidencian que la lesión colinérgica generada en el hipocampo de ratas, por administración de la colinotoxina AF64A, modifica el metabolismo de la glucosa, induce un deterioro en el aprendizaje y la memoria y es capaz de alterar la actividad y glicosilación de las colinesterasas. Asimismo, el consumo de una dieta alta en grasas acelera el deterioro cognitivo y afecta los patrones de glicosilación de AChE y BChE.

ABSTRACT

The increase in life expectancy has important implications for health systems worldwide. This has increased the age-associated diseases; including cognitive impairment is a condition that directly affects the quality of life of the adult population of the elderly. In addition, cognitive impairment without dementia is a high-risk condition for the onset of dementia, such as Alzheimer's disease. Furthermore, some chronic diseases such as diabetes mellitus have been shown a strong relationship with the development of Alzheimer's disease, by their direct or indirect effects on the brain.

The functionality of certain enzymes can be affected under pathological conditions, such as in Alzheimer's disease and diabetes mellitus. This is the case of cholinesterases. Thus, for example, has high cholinesterase activity detected in the neuritic plaques and neurofibrillary tangles characteristic of patients with Alzheimer's disease, which may be related to amyloid aggregation. It has been reported that a cholinesterase activity, also increases in diabetic patients, in which case, these modifying enzymes could be involved risk factors such as insulin resistance.

Furthermore, a variety postulated mechanisms that may have a common pathophysiological role in the development of metabolic disorders and cognitive disorders, cholinesterases can be a link between both conditions.

The aim of this study was to establish the association between the cholinergic deficit, memory dysfunction and energy metabolism, generating a model that

simulates cognitive impairment. The study animals were fed a normal or high-fat diet, as appropriate, and cognitive ability, biochemical parameters such as lipid profile and transaminases activity, and the activity and glycosylation of cholinesterases was evaluated.

The results show that the cholinergic lesion generated in the hippocampus of rats by administration of the cholinotoxin AF64A, modifies the metabolism of glucose , induces an impairment in learning and memory and is capable of altering the glycosylation activity of cholinesterases. Also, eating a high-fat diet accelerates cognitive decline and affects the glycosylation patterns of AChE and BChE.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. La memoria	1
I. 1. 1 Tipos de memoria	2
I. 1. 2. El deterioro cognitivo	4
I. 2. La enfermedad de Alzheimer	5
I. 2. 1. Aspectos clínicos de la enfermedad de Alzheimer.....	5
I. 2. 2. Aspectos neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer	6
I. 2. 3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer	8
I. 3. Los desórdenes del metabolismo energético.....	10
I. 3. 1. La Diabetes mellitus.....	10
I. 3. 2. Relación entre la DM y la EA	11
I. 4. Las colinesterasas	12
I. 4. 1. Generalidades.....	12
I. 4. 2. El gen de la acetilcolinesterasa y la proteína codificada en la rata	14
I. 4. 3. Funciones de la proteína AChE	16
I. 4. 4. El gen de la butirilcolinesterasa y la proteína codificada en la rata	17
I. 4. 5. Las funciones de la proteína BChE.....	18
I. 4. 6. Las colinesterasas en la EA.....	18
I. 4. 7. Las colinesterasas en los desórdenes energéticos.....	19

II. ANTECEDENTES	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	25
V. HIPÓTESIS.....	26
VI. OBJETIVOS.....	27
VI. 1. Objetivo general	27
VI. 2. Objetivos particulares	27
VII. METODOLOGÍA	28
VII. 1. Animales de experimentación	28
VII. 2. Inducción experimental de deterioro cognitivo	29
VII. 2. 1. Procedimiento quirúrgico: Estereotaxia	29
VII. 3. Evaluación de la función cognitiva	30
VII. 3. 1. Capacidad olfatoria.....	30
VII. 3. 2. Reconocimiento de objetos	31
VII. 3. 3. Laberinto acuático de Morris	32
VII. 3. 4. Condicionamiento aversivo al sabor.....	33

VII. 4. Determinación de parámetros bioquímicos	34
VII. 5. Extracción de colinesterasas por un método secuencial	34
VII. 6. Medición de la actividad enzimática	35
VII. 7. Cuantificación del contenido de proteínas totales	36
VII. 8. Análisis de incorporación de carbohidratos por interacción con lectinas.	37
VII. 9. Análisis estadístico	38
VIII. RESULTADOS.....	39
VIII. 1. Lesión en el hipocampo.....	39
VIII. 2. Determinación de parámetros fisiológicos	40
VIII. 3. Determinación de parámetros bioquímicos	41
VIII. 4. Evaluación de la función cognitiva.....	43
VIII. 4. 1. Capacidad olfatoria.....	43
VIII. 4. 2. Reconocimiento de objetos	43
VIII. 4. 3. Laberinto acuático de Morris	45
VIII. 4. 4. Condicionamiento aversivo al sabor	47

VIII. 5. Determinación de la actividad de las colinesterasas en hipocampo.....	48
VIII. 6. Determinación del contenido de las proteínas totales en hipocampo.....	49
VIII. 7. Estimación de la actividad específica de colinesterasas en hipocampo.	50
VIII. 8. Determinación de la actividad de colinesterasas en plasma	51
VIII. 9. Determinación de proteínas totales en plasma	52
VIII. 10. Estimación de la actividad específica de colinesterasas plasmáticas ..	53
VIII. 11. Análisis de incorporación de carbohidratos por interacción con lectinas	53
IX. DISCUSIÓN	58
X. CONCLUSIONES	75
XI. BIBLIOGRAFÍA	76

I. INTRODUCCIÓN

El aumento en la expectativa de vida ha tenido implicaciones importantes para los sistemas de salud en el ámbito mundial. Con ello se han incrementado las enfermedades asociadas con la edad, entre las que el deterioro cognitivo sin demencia y la demencia representan condiciones que afectan de manera directa la calidad de vida de la población adulta de la tercera edad (Mejía-Arango *et al.*, 2007).

El deterioro cognitivo sin demencia constituye una condición de alto riesgo para la aparición de la demencia. Asimismo, algunas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, han mostrado una fuerte relación con el desarrollo de la demencia por sus efectos directos o indirectos en el estado del cerebro (Mejía-Arango *et al.*, 2007).

En general, puede considerarse como deterioro a cualquier déficit de las denominadas funciones mentales superiores que aquejan a un adulto mayor. El más común, y en el que nos centraremos para fines de este proyecto, es la deficiencia de la memoria (Inouye *et al.*, 2007). Por ello resulta imprescindible hablar sobre la memoria y los métodos empleados para su evaluación.

I. 1. La memoria

La memoria es considerada una función intelectual relacionada estructural y funcionalmente con el sistema nervioso central (SNC); que se caracteriza por la adquisición, el almacenamiento y la reposición de la información y de las experiencias previamente aprendidas, ingresadas por alguna vía sensorial. En otras

palabras, se trata de un proceso mediante el cual la información adquirida se convierte en conocimiento, que es guardado para utilizarlo posteriormente, cuando sea necesario (Solís y López-Hernández, 2009).

Estudios experimentales, así como estudios clínicos realizados en humanos, destacan entre las estructuras cerebrales relacionadas con la memoria; hipocampo, tálamo, amígdala del lóbulo temporal, cuerpos mamilares y al cerebelo, entre otras y, respecto a la bioquímica, se enfatiza la participación de diversos neurotransmisores, entre los que destaca principalmente la acetilcolina.

I. 1. 1 Tipos de memoria

Existen diversos modelos de clasificación de la memoria, aunque no hay uno plenamente satisfactorio sobre la relación entre los diversos sistemas cognitivos y sus bases cerebrales.

Típicamente suele dividirse a la memoria en función de su permanencia en el tiempo en: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. Respecto a la naturaleza de lo que se recuerda, según el criterio de Larry Squire (2004), la memoria puede distinguirse en declarativa o explícita y no declarativa o implícita.

La memoria declarativa, que se subdivide en memoria semántica (conocimiento general) y episódica (autobiográfica) depende del lóbulo temporal medial y de sus proyecciones corticales, especialmente con la corteza prefrontal. Este tipo de memoria se describe como el recuerdo consciente y muestra características tales como la dependencia del contexto, la rapidez de la adquisición, la flexibilidad y la

complejidad representacional, lo que permite su estudio en modelos animales. En el caso de los roedores, las tareas más empleadas para estudiar la memoria declarativa incluyen el reconocimiento de objetos novedosos con ensayo único y la navegación en los laberintos, siempre y cuando se base en representaciones complejas y flexibles del contexto, siendo la búsqueda de una plataforma oculta en el laberinto acuático la más empleada (Squire, 2004).

Por su parte, la memoria no declarativa se define, por defecto, como aquella que no cumple las condiciones mencionadas para la memoria declarativa, lo que en términos concretos suele suponer aquella memoria que permanece preservada después de daño hipocampal. El término memoria no declarativa incluye, por tanto, una diversidad de recuerdos, no necesariamente conscientes, adquiridos gracias a las capacidades plásticas de los sistemas sensoriales, motores y emocionales que se ponen de manifiesto de manera más automática, cuando las situaciones lo requieren. Así, las áreas cerebrales que más intervienen en esta memoria son los ganglios basales que se relacionan con la ejecución motora, así como el cerebelo. En los roedores se emplean tareas de aprendizaje asociativo (miedo condicionado, evitación activa y pasiva, condicionamiento aversivo gustativo, entre otras) y no-asociativo (habitación, sensibilización) para investigar este tipo de memoria (Squire, 2004).

I. 1. 2. El deterioro cognitivo

En el cerebro, y de manera específica en la cognición, el envejecimiento es un proceso que representa un continuo que puede ir desde la disminución normal de las funciones cognitivas hasta la pérdida progresiva y patológica de éstas.

La función cognoscitiva de los ancianos puede verse afectada por los cambios propios del envejecimiento, pasando por el deterioro cognitivo leve (DCL) hasta la demencia (Masoro y Austad, 2006; Petersen, 2003).

El DCL se define como queja de pérdida de memoria subjetiva, con el resto de las funciones conservadas, con pruebas neuropsicológicas 1.5 desviaciones estándar por debajo de la media ajustada para edad y escolaridad (Petersen, 2003). Este trastorno se encuentra relacionado con un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer y usualmente representa una etapa muy temprana de la misma.

De los pacientes con DCL, entre un 10 y un 15% por año, evolucionan a enfermedad de Alzheimer, mientras que solo un 1-2% de los pacientes de la misma edad sin DCL evolucionan a enfermedad de Alzheimer (Kawas, 2003). Sin embargo, el DCL no sólo representa una etapa temprana o previa de la enfermedad de Alzheimer, ya que se ha observado que, también puede ser el presagio de otros tipos de demencia (Geldmacher y Whitehouse, 1996).

La demencia es un síndrome adquirido, con evolución crónica, de deterioro en la memoria y en al menos alguna otra función cognitiva (lenguaje, praxias, gnosias, función ejecutiva) que afecta la realización de las actividades de la vida diaria (APA, 2000). La más común, es justamente, la enfermedad de Alzheimer.

I. 2. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) -denominada así en honor a quien describiese el primer caso, Alois Alzheimer- es el tipo más frecuente de demencia (50-60 %) en la población de la tercera edad.

Se caracteriza por un déficit cognitivo y por algunos marcadores neuropatológicos, tales como placas neuríticas extracelulares y marañas neurofibrilares intracelulares (Figura 1). Normalmente, el primer síntoma patente es la pérdida de la memoria a corto plazo, que progresa desde simples olvidos hacia una pérdida consistente de la memoria a largo plazo y, finalmente, la parte más devastadora de la enfermedad: la pérdida de habilidades antes dominadas y la incapacidad de reconocer a las personas más cercanas (Gilman, 1997).

I. 2. 1. Aspectos clínicos de la enfermedad de Alzheimer

La EA es caracterizada por una disminución progresiva, y en última instancia pérdida, de múltiples funciones cognitivas, entre las que se incluyen el deterioro de la capacidad para aprender nueva información o para recordar información previamente aprendida y al menos alguno de los siguientes signos: pérdida de la capacidad de comprensión de palabras (afasia), pérdida de la capacidad para realizar tareas

complejas que implican la coordinación muscular (apraxia), pérdida de la capacidad de reconocer personas y utilizar objetos familiares (agnosia) y/o pérdida de la capacidad para planificar, organizar y ejecutar las actividades normales (Castellani *et al.*, 2010).

Desafortunadamente, la EA es implacablemente progresiva, a pesar de todos los tratamientos disponibles. El deterioro inicial de la memoria se convierte, a lo largo de meses y años, en desorientación, disfunción del juicio y de la personalidad, y alteraciones en el habla, entre otros signos. Con el tiempo el enfermo pierde la capacidad para cuidar de sí mismo. Los pacientes con EA suelen vivir sus últimos meses y años postrados en cama, a veces en un estado vegetativo, con úlceras sacras por decúbito. La causa inmediata de muerte, en la mayoría de los pacientes, es la neumonía, que se presenta como un final compasivo a una enfermedad prolongada y trágica, que ha robado al paciente afectado su individualidad y dignidad (Castellani *et al.*, 2010).

I. 2. 2. Aspectos neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer

La EA está asociada con neurodegeneración, que se caracteriza inicialmente por daño sináptico, seguido por pérdida neuronal, principalmente en la neocorteza y el sistema límbico, a lo que se atribuye la disfunción cognitiva. Se acompaña por astrogliosis, proliferación microglial y la presencia de marañas neurofibrilares (MNF) y placas neuríticas (PN) (Crews y Masliah, 2010).

Precisamente, las MNF y las PN (Figura 1) son las dos principales lesiones neuropatológicas asociadas con la EA y las que definen el diagnóstico, que ineludiblemente es *post mortem*.

Las MNF consisten de neuritas distróficas y acumulaciones anormales de la proteína Tau anormalmente fosforilada (hiperfosforilada) en el citoplasma de ciertas neuronas. Pueden observarse al microscopio como agregados, que están compuestos por fibrillas entrelazadas, conocidas como filamentos helicoidales apareados, cuyo principal componente estructural es la antes mencionada, proteína Tau, una proteína de unión a microtúbulos, cuya función es mantener el citoesqueleto de la célula neuronal, además de ayudar en el transporte de vesículas y organelos.

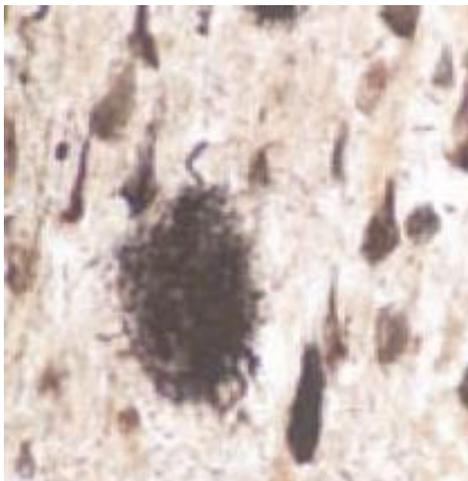


Figura 1. Tinción de plata que revela la histopatología característica de la enfermedad de Alzheimer. Se muestra en el centro la presencia de una placa neurítica, la cual está formada principalmente por la acumulación del péptido A β . Alrededor se puede observar la formación de marañas neurofibrilares, las cuales se acumulan en el interior de la neurona mostrando la característica forma de flama (Tomada de Campos-Peña y Meraz Ríos, 2006).

Las PN constan de un núcleo central del péptido amiloide beta (A β), un péptido de 40-42 aminoácidos que proviene de la proteína precursora del amiloide beta (PPA- β), una glicoproteína integral de membrana cuya función hasta el momento no es clara,

aunque se sabe que puede participar como factor de crecimiento, mediador de adhesión celular o regulador intraneural de calcio, entre otras funciones. El núcleo de A β está rodeado por procesos neuronales o neuritas anormalmente configurados, células microgliales y astrocitos reactivos (Campos-Peña y Meraz Ríos, 2006; Perl, 2010).

I. 2. 3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer

Aunque se desconoce concretamente el origen de la enfermedad, se han postulado varias hipótesis al respecto; la deficiencia del neurotransmisor acetilcolina, la cascada amiloide o la hiperfosforilación de Tau, que condicionan disfunciones del sistema colinérgico (Herholz *et al.*, 2008), son las más aceptadas.

A la fecha, se han sumado múltiples factores relacionados con el desarrollo de la EA: la reacción microglial (Farfara, *et al.*, 2008; Mizuno, 2012) la afección de otros sistemas de neurotransmisores -tal como el glutamatérgico- (Gazulla y Cavero-Nagore, 2006), la neuroinflamación (Rojo *et al.*, 2008), el estrés oxidante (Nunomura *et al.*, 2007), el daño mitocondrial (Fukui *et al.*, 2008), la disfunción metabólica (Erol, 2008; Irving *et al.*, 2009), las disfunciones hormonales (Tan *et al.*, 2008; Henderson, 2009) e incluso factores infecciosos por virus o priones (Jayadev *et al.*, 2011; Ashe y Aguzzi, 2013), así como factores alimentarios o contaminantes (Gu *et al.*, 2010); sin embargo, su relación aún está en debate.

Dada su relevancia en este estudio, haremos especial énfasis en la denominada hipótesis colinérgica, que atribuye la patogénesis de la EA a disfunciones en el SNC,

particularmente en el sistema de la neurotransmisión colinérgica. Estudios neuroquímicos en el hipocampo y en la corteza cerebral de pacientes con EA han demostrado una reducción de los marcadores presinápticos para neuronas colinérgicas, observándose una consistente disminución de la actividad de la colina acetiltransferasa (ChAT, por sus siglas en inglés), enzima encargada de la síntesis de acetilcolina (ACh), lo que conduce a una marcada reducción en la concentración del neurotransmisor, cuyo papel sobre la memoria se ha demostrado ampliamente (Bartus *et al.*, 1982; Whitehouse *et al.*, 1982).

El déficit colinérgico observado en la EA es atribuido a la pérdida selectiva de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert (nbM), el principal sitio de inervación colinérgica, cuyas neuronas poseen una elevada actividad de las enzimas ChAT y acetilcolinesterasa (AChE). Las neuronas del nbM proyectan hacia la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el tallo cerebral, el bulbo olfatorio, el hipocampo, la corteza entorrinal y la neocorteza, de tal manera que se halla en una posición crítica para integrar la información de una gran variedad de fuentes subcorticales e influir directamente sobre la corteza cerebral. De hecho, diversos estudios sugieren que las vías colinérgicas basales, principalmente aquellas que proyectan hacia la formación hipocampal, juegan un papel importante en los procesos de memoria (Whitehouse *et al.*, 1982).

I. 3. Los desórdenes del metabolismo energético

El metabolismo es un conjunto de múltiples procesos celulares, los cuales regulan tanto el almacenamiento de lípidos como la utilización de sustratos para asegurar que haya disponible suficiente energía para las funciones vitales, frente a una demanda continuamente cambiante de energía y la disponibilidad de alimentos (Figlewicz, 2003; Gao y Horvath, 2007; Lam *et al.*, 2009). Ocurre un trastorno/desorden metabólico cuando hay reacciones químicas anormales que interrumpen este proceso. Uno de los más comunes desórdenes metabólicos, lo representa la Diabetes mellitus.

I. 3. 1. La Diabetes mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico complejo, caracterizado por hiperglucemia crónica, dada por un déficit en la secreción y/o actividad de la insulina. La hiperglucemia sostenida se manifiesta a través de varios síntomas y signos característicos, como son: sed excesiva (polidipsia), hambre excesiva (polifagia), ganas muy frecuentes de orinar (poliuria), presencia de glucosa en orina (glucosuria), fatiga o cansancio (astenia), pérdida de peso, presencia de cuerpos cetónicos en sangre y orina (cetonemia y cetonuria, respectivamente), entre otros (Committee Report, 2008).

Este desorden se ha asociado con complicaciones micro- y macrovasculares, entre las que se incluyen la retinopatía, la nefropatía, la neuropatía y la enfermedad cardiovascular (Li y Holscher, 2007). Aunado a ello, en décadas pasadas la DM ha

recibido especial atención por su impacto sobre el SNC, particularmente en relación con las disfunciones cognitivas (Brands *et al.*, 2005). Se han asociado a la DM, los primeros cambios cognitivos en el aprendizaje y la memoria (Strachan *et al.*, 1997; Awad *et al.*, 2004).

I. 3. 2. Relación entre la DM y la EA

Se ha postulado que la EA y la DM tienden a ocurrir conjuntamente. Los mecanismos biológicos subyacentes que podrían vincular el desarrollo de la EA y la DM no se conocen completamente. Sin embargo, un procesamiento anormal de proteínas, alteraciones en la señalización de la insulina, la desregulación del metabolismo de la glucosa, el estrés oxidante, la formación de productos de glicación avanzada y la activación de vías inflamatorias, así como el desarrollo angiopático y citotóxico y la inducción de apoptosis, son características comunes a ambas enfermedades (Li y Holscher, 2007; Sims-Robinson *et al.*, 2010).

Algunos investigadores han tratado de identificar alguna(s) proteína(s) común(es) a ambas condiciones que pudieran sugerir un papel patogénico común. Para tal efecto, Sridhar y colaboradores (2006) realizaron un análisis *in silico* mediante el cual determinaron que las colinesterasas (butirilcolinesterasa y algunas variantes de acetilcolinesterasa) coexisten en la EA y en la DM.

I. 4. Las colinesterasas

I. 4. 1. Generalidades

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas que presentan una capacidad extraordinaria para hidrolizar ésteres de colina, en comparación con otros sustratos. Los vertebrados poseen dos tipos, codificadas por dos genes distintos, las cuales, dependiendo de sus características bioquímicas y fisiológicas se clasifican en: acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7, acetilcolina acetilhidrolasa, AChE) y butirilcolinesterasa (EC 3.1.1.8, acilcolina acilhidrolasa, BChE).

La AChE hidroliza a la acetilcolina mucho más rápido que a otros ésteres de colina y es mucho menos activa sobre la butirilcolina; la BChE hidroliza a la propionil- y butirilcolina, pero también a la acetilcolina (Massoulié *et al.*, 2005). Ambas enzimas son irreversiblemente inhibidas por organofosforados y pueden distinguirse por su reactividad con inhibidores específicos; el BW284C51 (dibromuro de 1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona) inhibe fuertemente a la AChE, mientras que la etopropazina, el iso-OMPA (tetraisopropil pirofosforamida) y el bambuterol reducen la actividad de la BChE. La AChE, contrariamente a lo que sucede con la BChE, es inhibida por exceso de sustrato.

Las ChEs son enzimas glicoproteínicas, que bien pueden estar unidas a la membrana o libres en el espacio extracelular. Su heterogeneidad está dada por varias formas moleculares (Figuras 2 y 3) que pueden distinguirse por el número de subunidades catalíticas y los componentes adicionales de éstas, así como por las

interacciones iónicas o hidrofóbicas, las características de solubilidad y las propiedades hidrodinámicas. Todas las formas moleculares de la BChE son generadas a partir de un mismo transcrito, en tanto que, las formas enzimáticas de la AChE están especificadas por variaciones en un proceso de corte-empalme alternativo (Rotundo, 1983; Soreq *et al.*, 1989).

Los polipéptidos de las ChEs son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, donde son glicosilados probablemente de una manera co-traducciona, es aquí donde incorporan varias unidades del oligoglucano base (NAcGlc)₂(Man)₉(Glc)₃ en restos de Asn de secuencias Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (X: cualquier aminoácido excepto prolina). Una vez ensambladas, las moléculas pasan por el aparato de Golgi, donde adquieren residuos de oligosacáridos adicionales, en las cisternas medias se incorporan residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico, y la galatosa en la región *trans* Golgi.

Las moléculas destinadas a permanecer unidas a la membrana son modificadas por la adición covalente de glicofosfolípidos o por asociación con otra cadena polipeptídica hidrofóbica. Posteriormente, son conducidas mediante vesículas de transporte a través de los microtúbulos a la superficie celular o son secretadas al medio extracelular. Cada forma molecular se ensambla por separado durante su maduración molecular y una vez ensambladas, son estables y no se interconvierten, de modo que las enzimas unidas a la membrana celular no son precursoras de las secretadas (Sánchez-Chávez y Salceda. 2008).

Se ha establecido que la correcta glicosilación de las formas moleculares de las ChEs es importante para el ensamblado de las subunidades en oligómeros, para la apropiada secreción y para proteger a la enzima frente a la proteólisis (Cabezas-Herrera *et al.*, 1994; Vidal, 1996). Dada la importancia de la glicosilación, se han diseñado herramientas que facilitan su estudio, así el uso de lectinas vegetales, ha sido de gran utilidad; la unión de concanavalina A (Con A), aglutinina de germen de trigo (WGA) o de lenteja *lens culinaris* (LCA) a una glicoproteína particular aporta evidencias indirectas de la presencia de manosa, N-acetilglucosamina o ácido siálico, o manosa asociada a centros de fucosa, respectivamente.

I. 4. 2. El gen de la acetilcolinesterasa y la proteína codificada en la rata

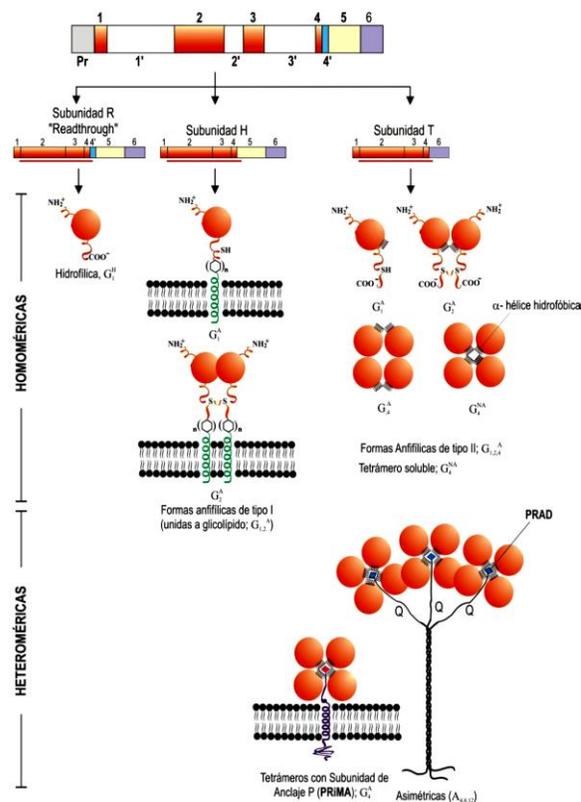
En la rata, el gen *Ache* (nombre oficial) se encuentra en el cromosoma 12, en la región q2 (en el humano el gene que codifica para la AChE se localiza en el cromosoma 7, región q22). Tiene una longitud de aproximadamente 7kb y posee 6 exones y 4 intrones.

Dependiendo de la edición alternativa en el extremo 3' de los transcritos y de modificaciones post-traduccionales, se originan tres variantes de AChE: T, H y R.

El ARNm tipo AChE-T está conformado por los exones E2-E3-E4 y E6 y la proteína producto genera monómeros, dímeros y tetrámeros anfifílicos (G_1^A , G_2^A y G_4^A , respectivamente), tetrámeros no anfifílicos (G_4^{NA}) y asociaciones hetero-oligoméricas. Si los tetrámeros se unen a la proteína transmembranal PRiMA (de "*Proline Rich Membrane Anchor*"; anclaje membranal rico en prolina) se forman

tetrámeros capaces de insertarse en las membranas (PRIMA-G₄^A) y si los tetrámeros se ligan a un tallo de tipo colagénico (ColQ), se generan las formas asimétricas A₄, A₈ y A₁₂ -con uno, dos y tres tetrámeros, respectivamente- (Dori y Soreq 2006, Perrier *et al.*, 2005, Deutsch *et al.*, 2002). El ARNm tipo AChE-H, contiene los exones E2-E3-E4-E5 y codifica para dímeros anfifílicos Tipo I que poseen una estructura de glucosfosfatidilinositol (GPI) unida covalentemente (Soreq *et al.*, 1990, Deutsch *et al.*, 2002). El ARNm tipo AChE-R, no sufre corte y empalme luego del último exón codificador del dominio catalítico y, por tanto, posee el arreglo E2-E3-E4-I4-E5-E6. Ya que el extremo C-terminal de la forma R consta de 30 aminoácidos adicionales y carece de residuos de Cys, las subunidades permanecen como monómeros (Grisaru *et al.*, 2006; Sternfeld *et al.*, 2000).

Figura 2. Formas moleculares de AChE. Se muestra el gene de la AChE, los mensajeros maduros generados por ensamblado alternativo y la variedad de formas moleculares que se obtiene de cada mensajero. La clasificación básica distingue a las formas asimétricas (A) y globulares (G). (Tomado de Martínez-Moreno, 2012).



I. 4. 3. Funciones de la proteína AChE

La función principal de la AChE es la eliminación rápida de la acetilcolina un milisegundo después de su liberación en las sinapsis colinérgicas, finalizando la transmisión del impulso nervioso y facilitando el control temporal preciso de la contracción muscular (Katz, 1966; Nachmansohn y Naumann, 1975; Rosenberry, 1979).

Además, la AChE parece jugar un papel importante en el crecimiento axonal (Bigbee *et al.*, 2000), sinaptogénesis (Sternfeld *et al.*, 1998a), adhesión celular (Bigbee y Sharma, 2004) y migración neuronal (Byers *et al.*, 2005; Dori *et al.*, 2005), funciones independientes de la capacidad enzimática para hidrolizar ACh (Soreq y Seidman, 2001) y más relacionadas con la fuerte tendencia que muestran ciertos dominios estructurales de las ChEs de interaccionar con otras proteínas.

La presencia de AChE en los progenitores de las células sanguíneas, sentó la base de su posible participación en los procesos de hematopoyesis y trombopoyesis (Grisaru *et al.*, 1999b; Lev-Lehman *et al.*, 1997; Paoletti *et al.*, 1992).

Asimismo, por su presencia en las estructuras histopatológicas que se observan en el cerebro de pacientes fallecidos con la EA, llevó a pensar que las ChEs estaban implicadas en la agregación del péptido A β o en la consolidación de las placas seniles.

I. 4. 4. El gen de la butirilcolinesterasa y la proteína codificada en la rata

El gen *Bche* (símbolo oficial), en la rata, se halla en el cromosoma 2, en la región q32 (en el humano el gen que codifica para la BChE se encuentra en el cromosoma 3, en la región q26.1-q26.2). Lo constituyen alrededor de 70 kb y está compuesto por 4 exones y 3 intrones.

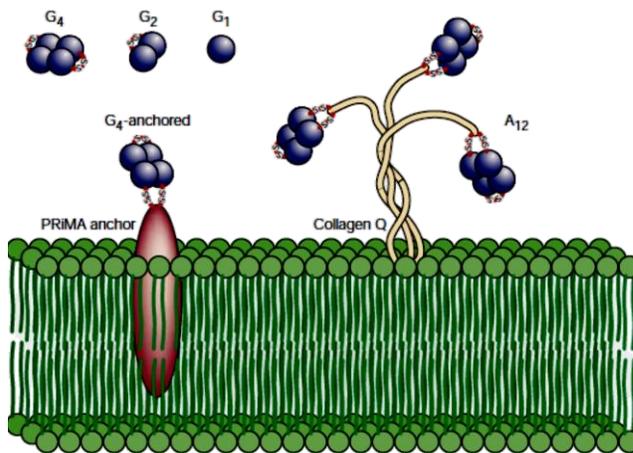


Figura 3. Formas moleculares de BChE. Se muestran las formas monomérica (G_1), dimérica (G_2) y tetramérica (G_4 , que predomina en el SNC). Se pueden apreciar los tipos de unión a membrana, mediante tallos de tipo colagénico o mediante la proteína PRiMA (Tomada de Darvesh *et al.*, 2003).

La expresión del gene produce un solo transcrito, de tipo BChE-T. La proteína codificada muestra diferentes formas moleculares, que incluyen monómeros (G_1), dímeros (G_2) y tetrámeros (G_4) solubles, además de formas G_4 ancladas a la membrana por la proteína PRiMA. También, se presentan formas asimétricas ancladas a membrana por un triplete helicoidal de tipo colagénico. Tales formas pueden incorporar de 1 a 3 tetrámeros y son conocidas como A_4 , A_8 y A_{12} , respectivamente (Darvesh *et al.*, 2003).

I. 4. 5. Las funciones de la proteína BChE

Mientras el papel de la AChE en la neurotransmisión colinérgica es bien definido, la función fisiológica real de la BChE continúa siendo desconocida. No obstante, existen evidencias relacionadas con su abundancia en el plasma sanguíneo, que han sugerido su participación en procesos de detoxificación de: succinilcolina, organofosforados y carbamatos, cocaína y algunas drogas anticonvulsivas (Reddy *et al.*, 1990; Çokuğraş, 2003).

Se ha sugerido que la elevada cantidad de BChE que circula libremente en el plasma de los mamíferos ejerce una función protectora, bien hidrolizando agentes tóxicos ingeridos oralmente, o bien, eliminando a la ACh vertida a la sangre, con el fin de prevenir acciones nicotínicas o muscarínicas no deseadas. A pesar de las numerosas variantes alélicas de BChE en humanos, parece que la actividad BChE no es imprescindible pues no se han observado anomalías fisiológicas o cambios patológicos en individuos deficientes o desprovistos de BChE (Grisaru *et al.*, 1999; Layer, 1995; Layer y Willbold, 1995; Soreq *et al.*, 1994; Soreq y Seidman, 2001).

I. 4. 6. Las colinesterasas en la EA

Se ha sugerido que las ChEs podrían participar en el proceso patológico de la EA. A este respecto, se ha informado que la presencia de las ChEs en el cerebro de pacientes con esta enfermedad no se limita a los elementos neurales normales, sino que se detectan elevadas actividades de AChE y BChE en las PN y las MNF, mismas que pueden ser histoquímicamente demostrables (Ciro *et al.*, 2012).

La BChE podría modificar el riesgo a desarrollar EA, por sí sola o en sinergia con la apolipoproteína E -alelo épsilon 4- (apoE- ϵ 4). Su participación, también se sugiere por su presencia en las PN encontradas en cerebros con demencia y por su localización en las MNF características de la EA (Raygani *et al.*, 2004).

Además, pacientes con la variante K de la BChE (variante polimórfica derivada de una mutación puntual que resulta en una reducción de la actividad enzimática), tienen propensión a formar hojas β , que pueden estar relacionadas con la formación de agregados del A β (Johansen *et al.*, 2004).

Por otro lado, la proteína AChE parece potenciar la agregación del A β y la toxicidad de tales agregados. Tal parece, que la actividad incrementada de la AChE es atribuida a niveles elevados de homocisteína, los cuales son correlacionados con problemas neurológicos; esta hiperhomocisteinemia conduce a apoptosis neuronal, presumiblemente por inducción de estrés oxidante y/o estrés de retículo endoplásmico (Stefanello *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2006).

I. 4. 7. Las colinesterasas en los desórdenes energéticos

En la DM, la actividad BChE parece estar involucrada, ya sea por medio de la formación de fibrillas amiloides o mediante la modificación de otros factores de riesgo como la resistencia a la insulina. Las fibrillas amiloides en los islotes pancreáticos producen exceso de radicales superóxido, peroxidación lipídica e inactivación de óxido nítrico, contribuyendo a la apoptosis de las células β (Johansen *et al.*, 2004).

En sujetos diagnosticados con resistencia a la insulina, establecida a través de una curva de tolerancia a la glucosa oral y el contenido de insulina en suero, se determinaron valores significativamente mayores en la actividad de BChE sérica, respecto a sujetos sanos. La hiperinsulinemia se ha correlacionado con una estimulación de la lipogénesis. A este respecto, se ha propuesto que la BChE participa en el metabolismo de lípidos como modulador de las dislipidemias y del SM (Krnic y Bradamante, 1997). Además, en sueros de pacientes con hiperlipemias y DM se han determinado niveles superiores de actividad BChE comparados con sujetos sanos, observándose una correlación positiva entre los niveles de colesterol total y una correlación negativa con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Kutty *et al.*, 1981; Rustemeijer *et al.*, 2001; Sridhar *et al.*, 2002; Alcántara *et al.*, 2005; Randell *et al.*, 2005).

En ratas diabéticas por la administración de estreptozotocina, se ha determinado un aumento en la actividad de AChE en islotes de Langerhans, en el tejido exócrino de páncreas, en comparación con los animales control (Rao *et al.*, 2007), y en otro modelo de roedor diabético, se ha informado un aumento y alteración en el ensamblado de estructuras poliméricas (Sánchez-Chávez y Salceda, 2000; Sánchez-Chávez y Salceda, 2001).

II. ANTECEDENTES

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre la DM y la EA. Estas enfermedades muestran características clínicas y bioquímicas que sugieren mecanismos patogénicos comunes. Ambas condiciones presentan amiloidosis, que se caracteriza por agregados de proteínas fibrilares: amilina en los islotes pancreáticos con DM tipo 2, que se asocian con pérdida de células pancreáticas, y A β y marañas neurofibrilares en el cerebro de pacientes con EA, que son asociados con pérdida neuronal (Götz *et al.*, 2009).

Un estudio histórico de cohortes estima que el riesgo de desarrollar EA incrementa tras el comienzo de la DM en el adulto (Leibson *et al.*, 1997). Un estudio longitudinal de sujetos de edad avanzada, sin demencia al inicio del estudio, demuestra que el riesgo relativo de presentar la EA entre las personas con DM es de 1.3 veces mayor (Luchsinger *et al.*, 2001). En un estudio de una comunidad de personas mayores de 75 años, libres de demencia, la DM fue asociada con el desarrollo subsiguiente de la EA (Qiu *et al.*, 2005).

Respecto a modelos animales, algunos estudios han demostrado que la inducción de DM en ratones conduce a la aceleración en la neuropatología tipo Alzheimer. El aumento en el nivel de A β , el número de placas A β inmunorreactivas, la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), y el grado de fosforilación de la proteína tau, todos factores que contribuyen a la neurodegeneración y pérdida neuronal en la EA, fueron evidentes en los ratones transgénicos después de la inducción

experimental de DM tipo 1. Por el contrario, la inducción de DM tipo 2 no hizo aumentar los niveles de A β en los cerebros de ratones transgénicos que desarrollan la EA, aunque el desarrollo de la DM produjo el inicio temprano de la disfunción cognitiva (Jolivalt *et al.*, 2010; Takeda *et al.*, 2010).

Tras diversos estudios efectuados, la relación entre la DM y la EA, aún no está completamente esclarecida. No obstante, como ha sido descrito en párrafos anteriores, pacientes con DM pueden desencadenar una serie de eventos que conduzcan al desarrollo de la EA, eventos que pueden relacionarse con la pérdida de la funcionalidad de las colinesterasas. Así pues, una visión complementaria, que vincule el desarrollo de desórdenes metabólicos con anomalías en la síntesis, procesamiento post-traducciona l y función de las colinesterasas, en sujetos con trastornos cognitivos, podría brindarnos un panorama más general de la situación.

III. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país, la población aproximada de personas con DM asciende entre 6.5 y 10 millones, según datos de la Federación Mexicana de Diabetes (FMD); más aún, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que para el año 2025 habrá un aumento del 100% de la incidencia mundial de este desorden. En pocos años nuestro país pasará de ocupar el noveno lugar mundial en la prevalencia de diabetes para alcanzar la séptima posición.

Según la Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares (AMAES) se estima que en México hay 350,000 - 600,000 personas que padecen EA y para el año 2025 el número de afectados podría rebasar el millón.

Dado el aumento estimado de la incidencia de EA y DM en los próximos años y teniendo en cuenta, que el deterioro cognitivo parece ser una complicación asociada con la diabetes, la relación entre ambas patologías resulta preocupante.

Se han postulado una gran variedad de mecanismos que pueden tener un papel fisiopatogénico común en la DM y en la EA, por ejemplo, anomalías metabólicas que confieren resistencia a insulina (dislipidemia e hipertensión) o la hiperglucemia *per se*, que perturban la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. No obstante, aún son necesarios estudios especialmente dirigidos a conocer con más exactitud la relación entre la diabetes y el deterioro cognitivo.

Según la “hipótesis colinérgica” sobre la etiología de la EA, ésta obedece a un déficit colinérgico por disminución del neurotransmisor ACh. En este sentido, el estudio de

las colinesterasas resulta interesante, ya que, si bien son pocos los estudios realizados a este respecto, éstos, resaltan su importancia no sólo como posibles blancos terapéuticos sino como marcadores tempranos del desarrollo de DM y EA.

IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una relación recíproca entre el desarrollo de desórdenes del metabolismo energético y de disfunciones en la memoria debido a un funcionamiento anormal de las colinesterasas?

¿Podrían propiciar las alteraciones en la memoria, desórdenes en el metabolismo energético?

V. HIPÓTESIS

Los desórdenes en el metabolismo energético representan un factor de riesgo para el desarrollo del deterioro cognitivo, pudiendo ser las colinesterasas el factor común a ambas patologías; entonces, si disminuimos la actividad colinérgica, por destrucción de neuronas colinérgicas en el hipocampo, generando así un modelo animal que manifieste disfunciones en la memoria, es posible que esos animales también tengan una mayor probabilidad de desarrollar desórdenes en el metabolismo energético.

VI. OBJETIVOS

VI. 1. Objetivo general

Establecer en un modelo de rata *Wistar* la asociación entre el déficit colinérgico, las disfunciones de la memoria y el metabolismo energético.

VI. 2. Objetivos particulares

- ✓ Conocer si existen diferencias en la función cognitiva en ratas con déficit colinérgico respecto a la función en ratas sanas.
- ✓ Determinar los cambios en parámetros bioquímicos en plasma de ratas con déficit colinérgico respecto a ratas sanas.
- ✓ Identificar si la actividad enzimática de AChE y BChE en cerebro y plasma de ratas con déficit colinérgico es alterada respecto a la actividad en ratas sanas.
- ✓ Establecer posibles diferencias en los patrones de glicosilación de la AChE y BChE en cerebro y plasma entre ratas con déficit colinérgico y ratas sanas.

VII. METODOLOGÍA

VII. 1. Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* con un peso de 280-350 g (4 meses de edad). Los animales fueron criados en el bioterio de la UAM-Iztapalapa y mantenidos con alimento y agua *ad libitum*, y con un ciclo de luz/oscuridad invertido (12/12 hrs). Los procedimientos de manutención y experimentación se siguieron según las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para el uso de animales de laboratorio.

Se utilizaron seis grupos de animales (n=3) (Figura 4). A todos los animales, se les registró semanalmente: consumo de alimento y agua, así como el peso corporal, durante 4 meses.

Figura 4. Esquema de distribución de los grupos de trabajo. La mitad de los grupos fue alimentada con una dieta normal (Chow) y el resto con una dieta alta en grasas, adicionada con 30% (P/P) de manteca y 8% (P/P) de sacarosa. Los controles permanecieron intactos durante todo el estudio. El grupo sham, lo constituyeron animales que fueron operados, pero no recibieron la toxina colinérgica. Los animales lesionados fueron aquellos a los que se les indujo deterioro cognitivo provocando una lesión colinérgica mediante la administración del AF64A por cirugía estereotáxica.



VII. 2. Inducción experimental de deterioro cognitivo

El deterioro cognitivo fue inducido mediante la administración intrahipocampal (ih) de AF64A (ion aziridinio de etilcolina). El AF64A es una neurotoxina colinérgica presináptica selectiva, que en inyección intracerebral en ratas induce la hipofunción colinérgica persistente, que imita la deficiencia colinérgica cortical y del hipocampo y el deterioro cognitivo observado en la enfermedad de Alzheimer, proporcionando un buen modelo de estudio.

La droga fue administrada mediante cirugía estereotáxica en la región CA1 del hipocampo (bilateralmente), bajo las siguientes coordenadas: Antero-posterior (AP): - 4.2 mm, Medial-lateral (ML): +/- 4.0 mm y Dorso-ventral (DV): - 3.3 mm, a partir de Bregma (Figura 5), según el atlas de Paxinos y Watson (1998). Los animales a los que se les indujo deterioro cognitivo fueron inyectados con AF64A (6 nmoles por cada lado), en tanto que los animales Sham recibieron una inyección de solución salina.

VII. 2. 1. Procedimiento quirúrgico: Estereotaxia

Previo a la cirugía, las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal (ip) con una mezcla de ketamina (70%) y xilacina (30%) (1 ml/kg de peso corporal). Una vez anestesiado el animal, se colocó en un instrumento esterotáxico y se fijó perfectamente el cráneo en los planos vertical y horizontal.

Luego de colocado el animal y siguiendo los procedimientos quirúrgicos asépticos necesarios, se realizó una incisión longitudinal sobre la piel que cubre al cráneo,

desde la comisura anterior de los ojos hasta el inicio de la musculatura del cuello. Se retiró el periostio y se expuso la calota. Se prosiguió a la localización del punto Bregma y se calcularon las coordenadas correspondientes.

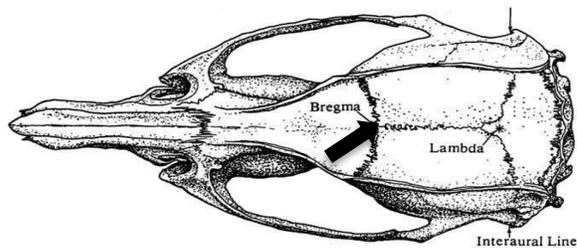


Figura 5. Vista dorsal del cráneo de una ratona Wistar. Se muestran los dos principales puntos de referencia utilizados para calcular coordenadas estereotáxicas. Se destaca Bregma (flecha), punto de coincidencia de las suturas interparietal y frontoparietal, utilizado como referencia en este trabajo (Tomada de Paxinos y Watson, 1998).

Una vez localizadas las coordenadas y mediante una fresa de corona esférica, se perforó la calota craneal hasta dejar expuesta la duramadre. Con ayuda de una jeringa Hamilton se inyectaron 2 μ l de AF64A, en cada hemisferio cerebral, a una velocidad de 0.5 μ l/min.

Finalmente, la incisión fue suturada y los animales se mantuvieron en recuperación durante dos semanas.

VII. 3. Evaluación de la función cognitiva

VII. 3. 1. Capacidad olfatoria

Los animales fueron colocados individualmente en una jaula (25 x 50 x 15 cm) con aserrín limpio cubriendo el suelo. En cada prueba fue colocado en un sitio estratégico un trozo de manzana (5 mm³), escondida bajo el aserrín. La prueba tuvo una

duración de 3 min y se registró el tiempo que el animal tomó para encontrar la manzana.

VII. 3. 2. Reconocimiento de objetos

Antes de comenzar y con el fin de que los animales reconocieran el nuevo espacio, éstos fueron habituados en la caja donde posteriormente fue realizada la prueba. La habituación se llevó a cabo por 3 días, durante los cuales, cada uno de los animales fue colocado dentro de la caja durante un periodo de 5 min. Entre cada animal, la caja fue perfectamente desodorizada con alcohol.

La sesión de prueba constó de cuatro fases: tres de muestra y una de prueba, con una duración de 3 min cada una. Entre cada fase el animal fue devuelto a su jaula y tanto la caja como los objetos utilizados se limpiaron minuciosamente con alcohol para evitar olores que pudieran interferir con la prueba. Durante las fases de muestra, cada animal fue colocado en la caja con cuatro objetos (hallados sobre el piso de la caja, al centro de la misma y equidistantes entre ellos) y se midió el tiempo en que el animal invirtió explorando cada uno de los objetos. En la fase de prueba uno de los objetos fue sustituido por otro de un material distinto, que fue colocado en la misma posición que el objeto anterior. Al igual que en las fases de muestra, fue medido el tiempo de exploración de cada objeto. Cada fase fue realizada a intervalos de 1 hora. La prueba se consideró satisfactoria si el animal empleaba más tiempo explorando el objeto novedoso.

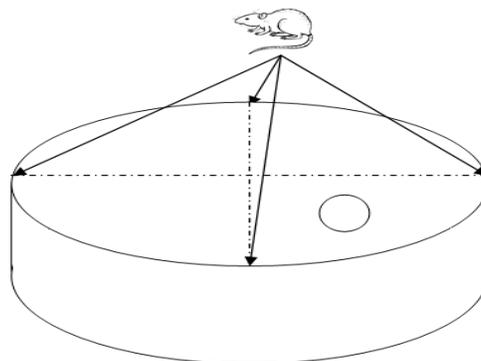
VII. 3. 3. Laberinto acuático de Morris

Se llevó a cabo en una piscina circular (de plástico) de 180 cm de diámetro y una altura de 30 cm, llena de agua (a 25°C), teñida con pintura blanca. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes, en uno de los cuales (cuadrante suroeste) se situó una plataforma de 15 cm de diámetro, sumergida aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del agua. La piscina fue rodeada con 4 señales extra-laberinto para ayudar a localizar la meta invisible.

La fase de aprendizaje consistió en 4 ensayos por día, durante 4 días (4 sesiones). En cada uno de los ensayos de la sesión, el animal se introdujo en una posición de comienzo distinta, partiendo cada vez desde uno de los cuatro puntos cardinales (Figura 6). En dichos ensayos se introdujo al animal con el hocico apuntando hacia las paredes de la piscina y se permitió al animal nadar durante 60 s, para que buscara la plataforma; en caso de no encontrarla, se guio al animal hacia la plataforma y se colocó en ella 30 s. Se consideró que un animal había encontrado la plataforma cuando permaneció en ella al menos 10 s. Luego de cada ensayo, se mantuvo al animal durante un tiempo de 30 s en la plataforma (periodo inter-ensayo), antes del comienzo del siguiente ensayo. Una vez finalizados los ensayos, y tras un período de secado, los animales fueron devueltos a sus jaulas. El parámetro a evaluar en cada ensayo fue la latencia de escape, es decir, el tiempo que tardaron las ratas en encontrar la plataforma y subir en ella. Luego de la fase de aprendizaje, se realizó una prueba final de retención, sin plataforma, durante 60 s. El parámetro

que se analizó en esta fase fue el tiempo de permanencia de las ratas en cada uno de los cuatro cuadrantes en los que se dividió la piscina.

Figura 6. Representación esquemática del laberinto acuático de Morris. Se muestran los cuadrantes en los que fue dividida la piscina, la posición de la plataforma de escape (círculo) y las posiciones en las que colocó al animal al comenzar cada uno de los ensayos de la sesión (flechas).



VII. 3. 4. Condicionamiento aversivo al sabor

Se empleó sacarina comercial al 0.1% (P/V) como sabor utilizado como estímulo condicionado y una inyección ip de LiCl 0.2 M como el agente inductor de malestar, es decir, el estímulo no-condicionado.

El día 1 los animales fueron privados de agua. Durante los días 2-5 los animales fueron entrenados para tomar su ración diaria de agua; se le ofreció a cada animal un bebedero con 100 ml de agua un lapso de 10 min, dos veces al día, registrando la cantidad de agua ingerida. El día 6 fue el de condicionamiento, los animales recibieron un bebedero con la solución de sacarina y se les permitió beber durante 10 min; 20 min más tarde los animales fueron inyectados con LiCl (7.5 mL/kg). En los días 7-9 los animales recibieron dos bebederos: uno con agua y otro con la solución de sacarina. Se permitió a los animales beber durante 10 min, dos veces al día y se midió la cantidad que consumieron de cada solución.

VII. 4. Determinación de parámetros bioquímicos

Al finalizar el experimento se cuantificaron los contenidos de colesterol, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), triacilglicéridos, y las actividades enzimáticas de GPT (Transaminasa glutámico-pirúvica, también conocida como ALAT: Alanina aminotransferasa), GOT (Transaminasa glutámico-oxalacética, también denominada ASAT: Aspartato aminotrasferasa) y GGT (γ -glutamil transpeptidasa), mediante el uso de tiras reactivas que se leyeron en un aparato Reflotron[®] Plus (Roche, México).

Se realizó una curva de tolerancia a la glucosa (CTG), para lo cual se administró a cada animal 2 g/Kg de peso de glucosa (dextrosa anhidra pura) por vía intragástrica y se valoró la glucemia a los tiempos 0 (antes de la administración de glucosa), 30, 60, 90 y 120 min (después de la administración de glucosa), usando un glucómetro Accucheck Performa (Roche).

Para todas las pruebas se utilizó sangre extraída de la vena caudal de la rata. Cuando lo requirió la prueba, la sangre fue procesada para obtener suero o plasma; las muestras fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 15 min (Eppendorf, E.U.A.). El anticoagulante utilizado fue EDTA 0.5 mM disuelto en NaCl 154 mM.

VII. 5. Extracción de colinesterasas por un método secuencial

Para la extracción de las colinesterasas se emplearon aproximadamente 100 mg de hipocampo en peso húmedo (previamente perfundido). Las muestras fueron homogenizadas en 10 volúmenes de amortiguador HEPES salino (HEPES 15 mM,

NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5), con una mezcla de antiproteasas al 10% p/V del amortiguador. El homogenado inicial fue centrifugado a 100,000 x g durante 1 h a 4°C, para separar AChE y BChE solubles o débilmente unidas a las membranas. Se recuperó el sobrenadante (al que en lo sucesivo se denominará S₁) y el precipitado se homogenizó en amortiguador HEPES salino con Triton X-100 al 1% V/V. Ésta suspensión se centrifugó (bajo las mismas condiciones con las que se obtuvo la fracción S₁) para obtener la enzima ligada a las membranas en el sobrenadante (S₂). Posteriormente, se determinó la actividad de AChE y BChE en las dos fracciones de la extracción.

VII. 6. Medición de la actividad enzimática

La estimación de la actividad colinesterásica fue determinada mediante el método de Ellman y colaboradores (1961), adaptado a un microensayo (Campoy, 1992). Se utilizaron placas de microtitulación con 96 pocillos de 400 µl. El medio de reacción contenía amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.5 con ácido ditiobenzoico (DTNB) 0.39 mM, yoduro de acetil- o butiriltiocolina 1 mM, y el inhibidor correspondiente: Iso-OMPA 50 µM o BW284C51 10 µM, para actividad de AChE y BChE, respectivamente. Para un volumen final de 275 µl, se depositaron en cada pocillo: 25 µl de muestra, 225 µl del medio de reacción (incubación de las muestras con los reactivos durante 20-30 min (para eliminar las interferencias de DTNB con los grupos tioles de las proteínas), y la reacción se desarrolló.

El cambio de absorbancia, debido a la hidrólisis espontánea del sustrato, fue valorado en varios pocillos “blanco”, a los que se les añadió el amortiguador de fosfatos en lugar de muestra. La reacción fue iniciada cuando se añadieron 25 μ l de análogos de los sustratos a 11 mM (acetiltiocolina o butiriltiocolina, según fuera el caso) e inmediatamente, después se realizó la lectura de la placa, que correspondió al tiempo cero, seguida de varias lecturas más a diferentes tiempos, mientras se desarrolló la reacción.

La actividad AChE o BChE representaron los micromoles de tiobenzoato (TNB) producidos en una hora, por mililitro de muestra ($U = \mu\text{mol/h/ml}$). El valor anterior se empleó para calcular la actividad específica que represento, el número de unidades de enzima AChE o BChE por miligramo de proteína (U/mg).

VII. 7. Cuantificación del contenido de proteínas totales

La cantidad de proteínas totales se estimó por el método de Bradford (1976), que se basa en la unión del colorante a las proteínas. Este método implica la unión de Azul brillante de Comassie G-250 con los residuos de aminoácidos de Arg y en menor grado con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe de la proteína, que provoca un cambio en el máximo de absorbancia del colorante desde 465 a 595 nm. El azul brillante de Comassie G-250 existe en dos formas con dos colores diferentes rojo y azul, siendo la forma roja la que se convierte en azul al interaccionar con las proteínas. La intensidad del color es proporcional con el contenido de proteína.

Para valorar el contenido de proteínas, se elaboraron dos rectas patrón a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA, siglas en inglés): 5 µg/10 ml y 28.2 µg/10 ml. Se repartieron volúmenes de 0, 2, 4, 8, 10 µl y se completaron a 10 µl con agua desionizada. Los volúmenes de muestra, los cuales fueron diluidos a 1:10, fueron de 10 µl. Cada muestra se preparó por tetraplicado. Se agregó a las muestras 200 µl del reactivo de Bradford, esperando 5 minutos para leer a 595 nm.

VII. 8. Análisis de incorporación de carbohidratos por interacción con lectinas

Las fracciones extraídas de la región hipocampal de las ratas se incubaron con lectinas de distinta especificidad inmovilizadas en un soporte de tipo agarosa durante 18 h a 4 °C, en agitación constante, en una relación de 2 volúmenes de muestra por 1 volumen de matriz. Los complejos lectina-colinesterasa formados se separaron por centrifugación a 10,000 x g por 5 min y, enseguida, en los sobrenadantes, se determinaron las actividades de AChE y BChE. Se utilizó la matriz Sefarosa-4B como control de enzima de unión inespecífica. El porcentaje de interacción se calculó comparando con la actividad del control negativo y la estimada en los sobrenadantes (no-ligada), tras la interacción con las lectinas.

VII. 9. Análisis estadístico

Los parámetros fisiológicos y bioquímicos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

La función cognitiva fue analizada mediante un ANOVA de medidas repetidas, seguido de la prueba *post-hoc* de Newman-Keuls (para el reconocimiento de objetos) o LSD de Fisher (para el laberinto acuático de Morris y el CAS).

La actividad colinesterásica, así como la interacción con lectinas fueron analizadas con un ANOVA de una (para las muestras de plasma) o dos vías (para las muestras de hipocampo), seguido de la prueba *post-hoc* de Bonferroni

El nivel de confianza en todos los casos fue igual o mayor al 95% ($p < 0.05$).

VIII. RESULTADOS

VIII. 1. Lesión en el hipocampo

Para establecer las coordenadas estereotáxicas precisas de la región CA1 del hipocampo y confirmar la administración adecuada del AF64A, se inyectó el colorante azul de metileno para corroborar el sitio de lesión.

En la Figura 7A se muestra un corte coronal de cerebro de rata en la que se resalta en color azul, la región CA1 del hipocampo correspondiente el sitio de inyección. Sobre el corte de cerebro se halla superpuesto un mapa estereotáxico, para verificar el sitio de lesión. El detalle del mapa estereotáxico se observa en la Figura 7B.

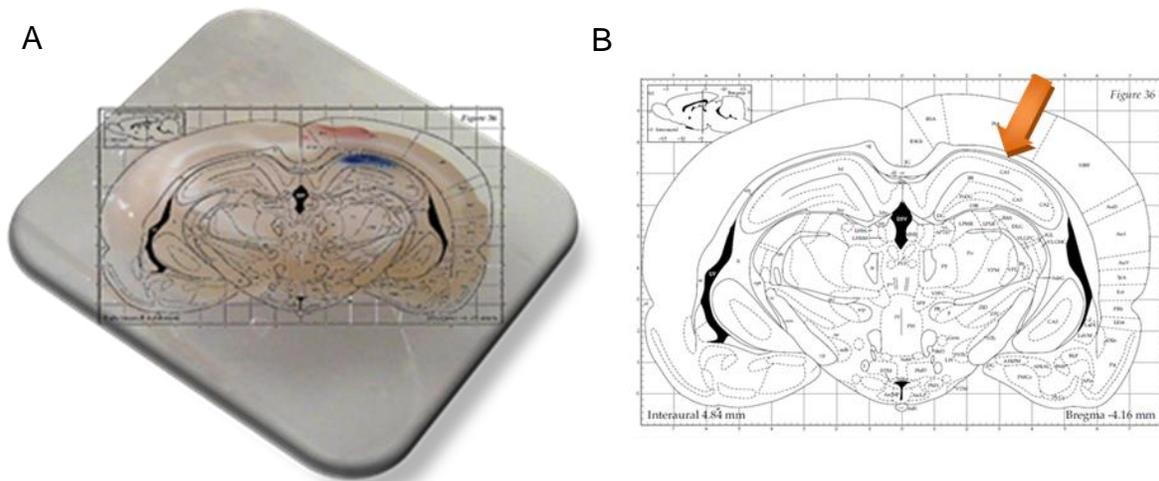


Figura 7. Región lesionada en el hipocampo de rata. (A) Localización del sitio de administración de la droga AF64A en la región CA1 del hipocampo de rata, teñida con azul de metileno. (B) Mapa estereotáxico de un corte transversal de cerebro de rata donde se resalta (flecha naranja) la región CA1 del hipocampo (Tomado de Paxinos y Watson, 1986).

VIII. 2. Determinación de parámetros fisiológicos

Con base en los resultados obtenidos, se muestra que no hubo diferencias significativas en los pesos registrados de los animales mantenidos en las diferentes condiciones experimentales y los grupos controles (Figura 8A). A pesar de que los animales alimentados con dieta alta en grasa, consumieron una menor cantidad de alimento comparados con los grupos control y sham (Figura 8B).

En cuanto a la ingesta de agua, no hubo diferencias significativas en los grupos estudiados (Figura 8C).

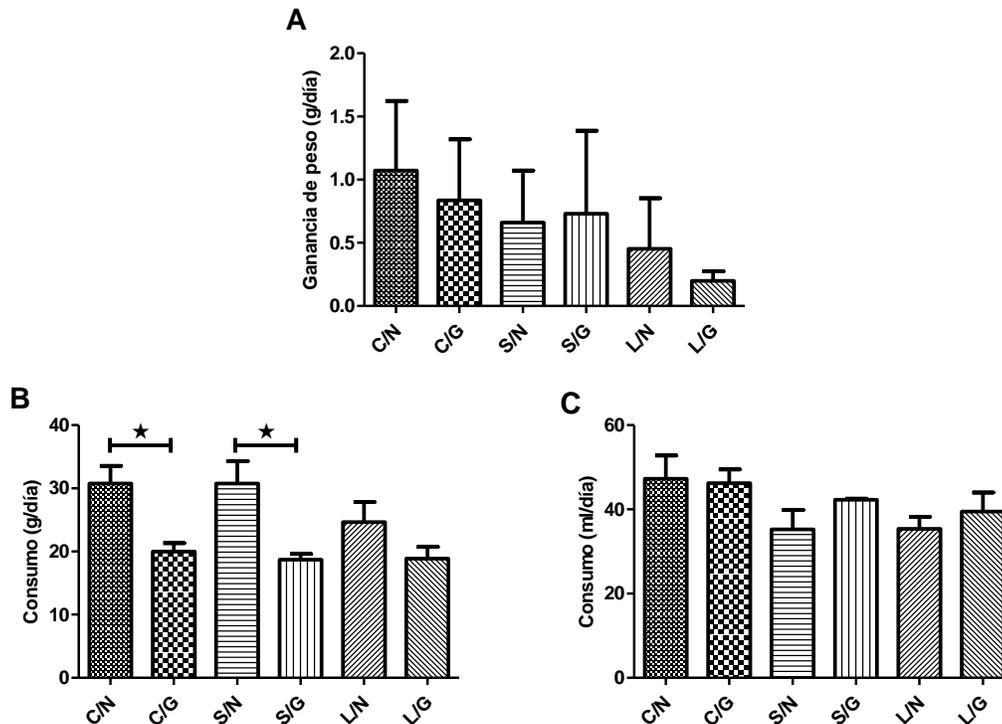


Figura 8. Parámetros fisiológicos. (A) Ganancia de peso por día (B) Consumo diario de alimento (C) Consumo diario de agua. Las barras representan el promedio (n=3) + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. * $p < 0.05$

VIII. 3. Determinación de parámetros bioquímicos

En cuanto al perfil lipídico en suero, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, encontrándose niveles normales de colesterol total, C-HDL y triacilglicéridos (Figura 9A).

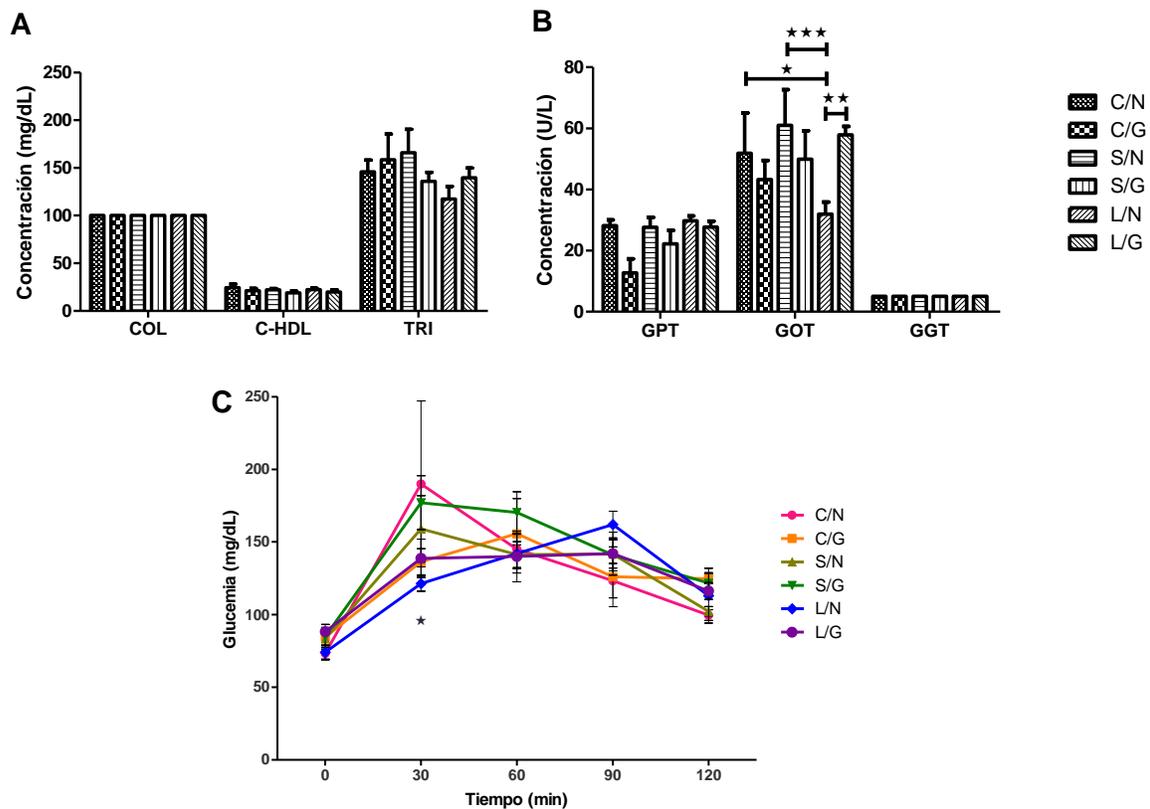


Figura 9. Parámetros bioquímicos. (A) Perfil lipídico (B) Transaminasas séricas (C) Curva de tolerancia a la glucosa. Las barras representan el promedio (n=3) + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. COL: Colesterol, C-HDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, TRI: Triacilglicéridos. GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica (ALAT), GOT: Transaminasa glutámico-oxalacética (ASAT), GGT: γ -glutamil transpeptidasa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

La evaluación de las transaminasas mostró una disminución estadísticamente significativa en la enzima GOT (ASAT) en los animales que recibieron AF64A, respecto a los niveles encontrados en los animales sham y control; además se encontró un aumento significativo en los animales lesionados que fueron alimentados con una dieta alta en grasas, respecto al grupo correspondiente con dieta normal (Figura 9B). No se encontraron cambios estadísticamente significativos en los niveles de GPT (ALAT) ni de GGT.

Finalmente, a pesar de que todos los animales estudiados se encontraron normoglucémicos, es claro que la lesión colinérgica produjo una alteración en el metabolismo de glucosa. En la Figura 9C se puede apreciar que los animales control con dieta normal, muestran una curva normal de tolerancia a la glucosa, es decir, puede apreciarse el pico característico a los 30 minutos -tras la administración intragástrica de glucosa- y un posterior descenso progresivo hacia las dos horas post-carga, lo que no logra observarse en los animales lesionados, en cuyo caso el pico glucémico máximo se alcanza a los 90 minutos posteriores a la administración. La dieta alta en grasas es capaz de alterar la curva de tolerancia a la glucosa, lo que resulta ser más evidente en el grupo control. No obstante, sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa a los 30 minutos posteriores a la administración de glucosa, entre los animales lesionados y aquellos pertenecientes al grupo control (con dieta normal).

VIII. 4. Evaluación de la función cognitiva

VIII. 4. 1. Capacidad olfatoria

Los resultados indican que todos los animales estudiados mantienen intacto su sistema olfatorio (Figura 10), ya que en los diferentes grupos, los animales fueron capaces de encontrar la manzana escondida en el tiempo estipulado; esto nos garantiza que los resultados subsiguientes sean efecto propio de alteraciones en la memoria y no en su principal sistema sensorial: el olfato.

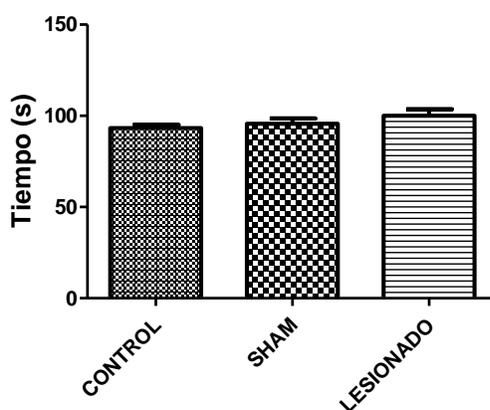


Figura 10. Capacidad olfatoria. Las barras representan el promedio (n=6) + EEM.

VIII. 4. 2. Reconocimiento de objetos

Se evaluó la tarea de reconocimiento de objetos en los diferentes grupos de estudio. En la Figura 11 se observa la habituación a los objetos en las fases de muestra, lo que se refleja en un menor tiempo de exploración de los objetos a lo largo de tales fases. Luego de la sustitución de un objeto por el objeto novedoso (objeto 3, en la

fase de prueba), tanto los animales control (con cualquiera de las dietas) como los sham (con dieta normal, únicamente) lograron reconocer este último como nuevo y emplearon un tiempo significativamente mayor explorándolo, no así los animales lesionados, que en la fase de prueba no logran discriminar entre objetos familiares y el novedoso, mostrando mayor interés por uno de los objetos conocidos, sugiriendo una pérdida de la memoria a corto plazo, particularmente de la memoria episódica que se evalúa en esta prueba.

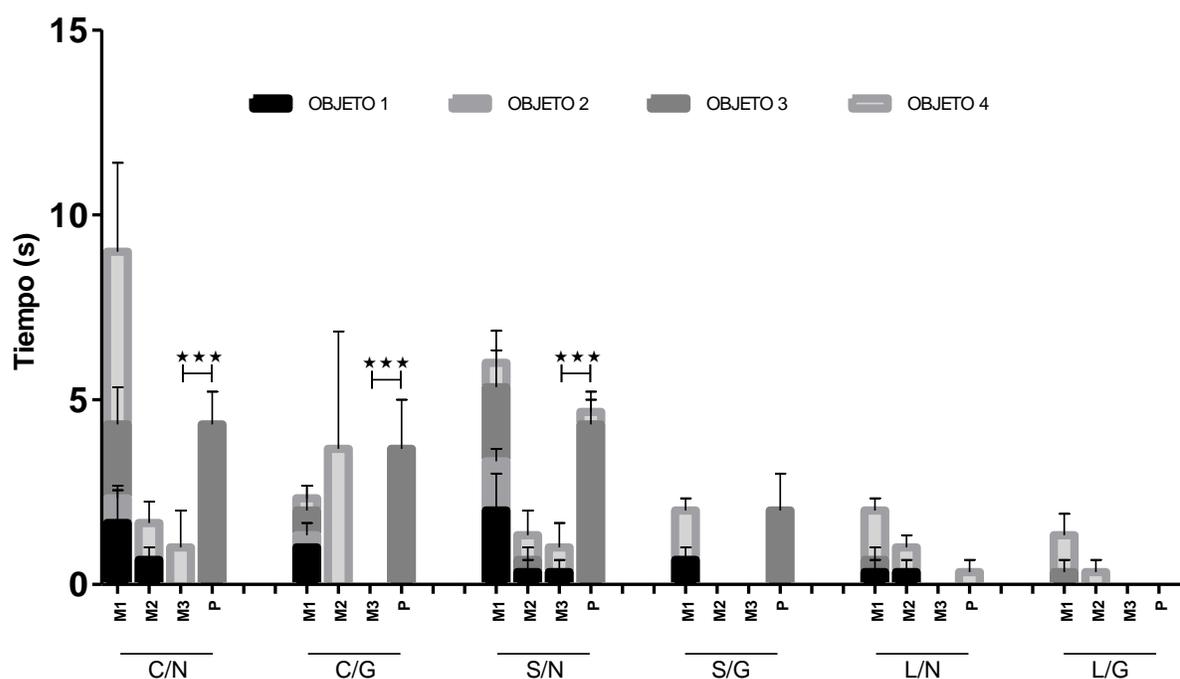


Figura 11. Reconocimiento de objetos. Las barras representan el promedio (n=3) + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. M1-M3: Fases de muestra; P: Fase de prueba; *** $p < 0.001$

VIII. 4. 3. Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris permitió evaluar el aprendizaje y la memoria espacial, donde fue notable que los animales a los que se les administró la neurotoxina colinérgica, así como los animales sham alimentados con una dieta alta en grasas, mostraron un deterioro en el aprendizaje espacial. Los animales lesionados generaron una pendiente poco pronunciada al valorar la latencia de escape, es decir muestran una limitada capacidad de aprendizaje espacial; por el contrario, ambos grupos control y el grupo sham con dieta normal, exhiben un aprendizaje espacial estadísticamente significativo tras cuatro sesiones en el laberinto acuático de Morris (Figura 12).

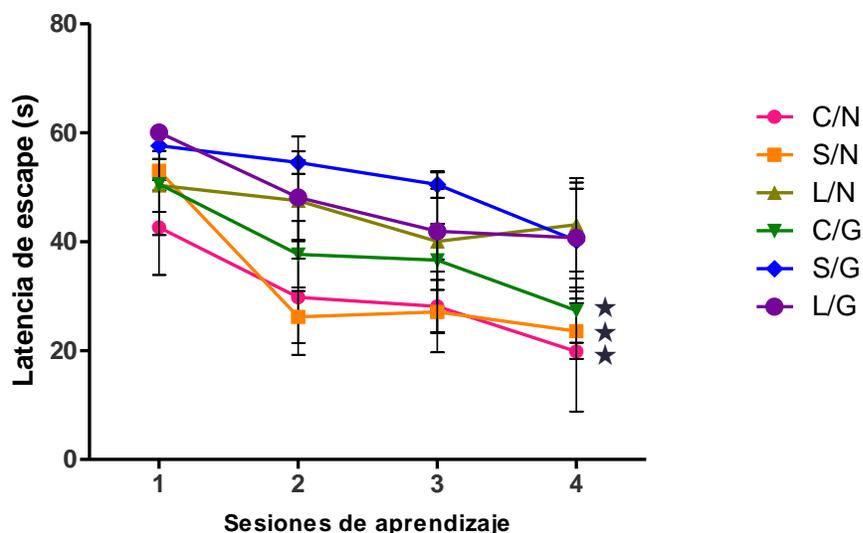


Figura 12. Aprendizaje espacial, evaluado en el laberinto acuático de Morris. Los puntos representan el promedio de cuatro ensayos ($n=3$) \pm EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. * $p<0.05$

No obstante el mejor aprendizaje de los animales control, en la prueba final de retención (sin plataforma de escape), no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 13). Cabe señalar que ninguno de los grupos de animales se mantuvo en el cuadrante blanco, es decir, en aquel donde anteriormente se hallaba la plataforma de escape, sino que emplearon más tiempo nadando en torno a uno de los cuadrantes adyacentes.

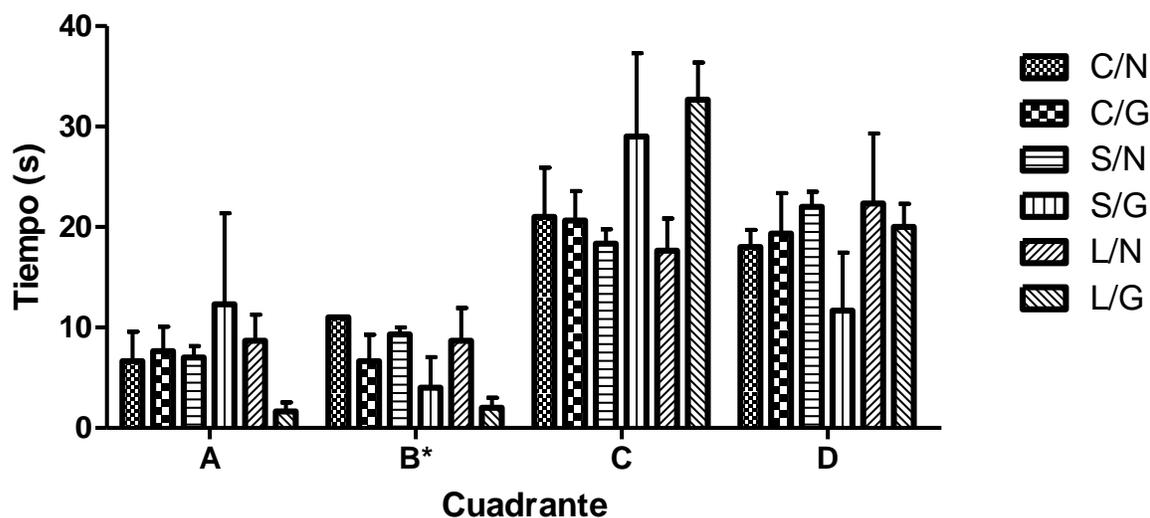


Figura 13. Memoria espacial, evaluada en el laberinto acuático de Morris. Las barras representan el promedio (n=3) + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. B* representa el cuadrante blanco.

VIII. 4. 4. Condicionamiento aversivo al sabor

Se llevó a cabo el paradigma conductual de condicionamiento aversivo al sabor. Donde se observó, que únicamente los animales control, alimentados con una dieta normal, se condicionaron ante el sabor aversivo, manifestándose mediante la disminución en el consumo de sacarina; ninguno de los grupos restantes revela este tipo de aprendizaje (Figura 14).

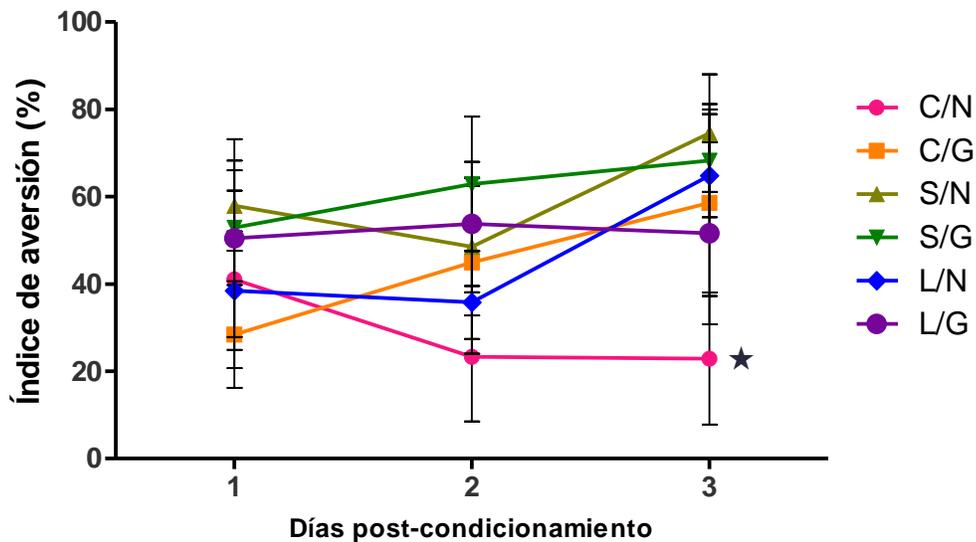


Figura 14. Condicionamiento aversivo al sabor. Los puntos representan el promedio (n=3) \pm EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. * $p < 0.05$

VIII. 5. Determinación de la actividad de las colinesterasas en hipocampo

Se estimó la actividad enzimática en hipocampo en las fracciones solubilizadas sin detergente (S_1) y con Triton X-100 (S_2).

Cabe destacar, inicialmente, que se encontró una mayor actividad de AChE que de BChE (Figura 15), confirmando informes previos de la distribución de las enzimas en el cerebro de mamíferos.

El análisis de las fracciones de la AChE mostró que la fracción de enzima anclada a la membrana, presenta una mayor actividad que la fracción enzimática débilmente unida, concordando con el hecho de que el transcrito AChE-T es el mayormente expresado en cerebro (y el que expresa las formas asimétricas). Este mismo comportamiento, se observó en el caso de la actividad de BChE. Esto es, hay una mayor actividad en la fracción de formas enzimáticas fuertemente unidas a membrana, que las débilmente asociadas.

La lesión colinérgica generada en el hipocampo no indujo cambios estadísticamente significativos en la actividad de AChE, pero sí en la de BChE, en cuyo caso la actividad disminuyó significativamente en los animales lesionados.

Por otra parte, la actividad de la AChE en la fracción S_2 , disminuyó significativamente con la ingesta de alimento alto en grasas.

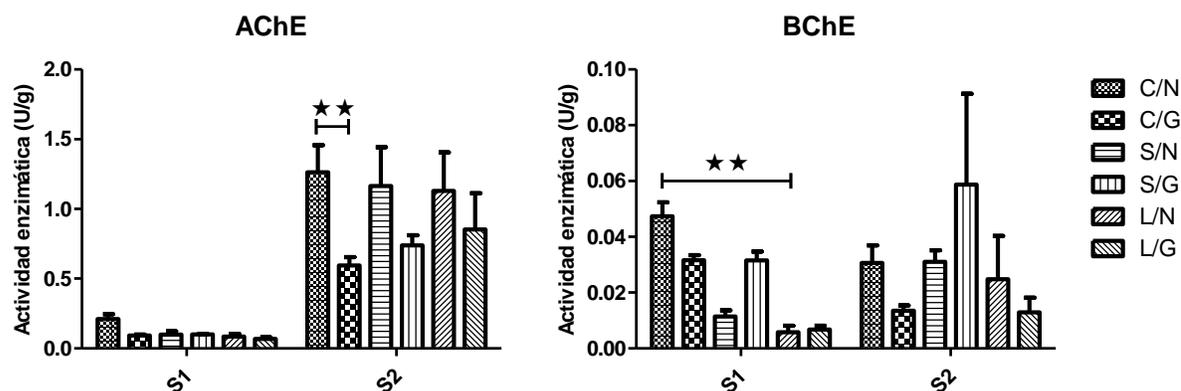


Figura 15. Actividad enzimática de las colinesterasas en el hipocampo de rata. Las barras representan el promedio (n=3) de un experimento realizado por triplicado + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. **p<0.01. Nótese la diferencia en la escala de las gráficas.

VIII. 6. Determinación del contenido de las proteínas totales en hipocampo

Se determinó la concentración de proteínas en ambas fracciones obtenidas de hipocampo (S₁ y S₂). Se encontró diferencia estadísticamente significativa en el contenido de proteínas en la fracción S₂ en los animales lesionados con dieta alta en grasas respecto al grupo correspondiente con dieta normal. Cabe señalar que, aunque no resulta ser estadísticamente significativo, en todos los grupos sometidos a una dieta alta en grasas, parece haber una tendencia a aumentar ligeramente el contenido proteínico en la fracción S₁ y disminuir en la fracción S₂.

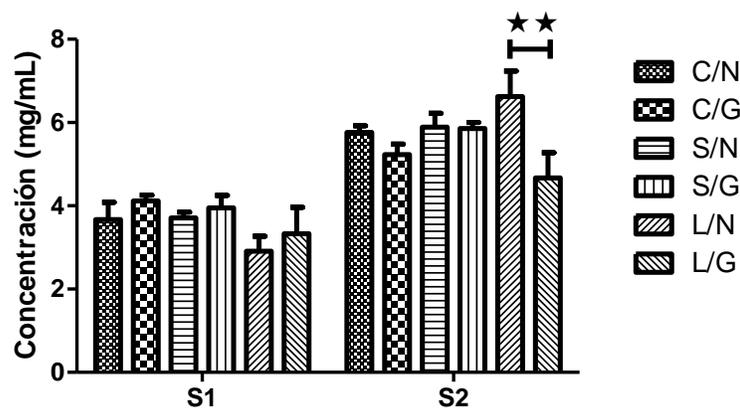


Figura 16. Contenido de proteínas totales en hipocampo. Las barras representan el promedio (n=3) de un experimento realizado por triplicado + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. **p<0.01

VIII. 7. Estimación de la actividad específica de colinesterasas en hipocampo

Se determinó la actividad específica de AChE y BChE en el hipocampo. Los resultados no evidencian diferencias estadísticamente significativas entre grupos por efecto de la lesión colinérgica en el caso de la actividad de la AChE. No obstante, la actividad de la enzima BChE disminuyó significativamente en el grupo de animales lesionados en el hipocampo..

Además, se observó una disminución significativa de la actividad de la AChE en la fracción S₂ por influencia de la dieta en el grupo control.

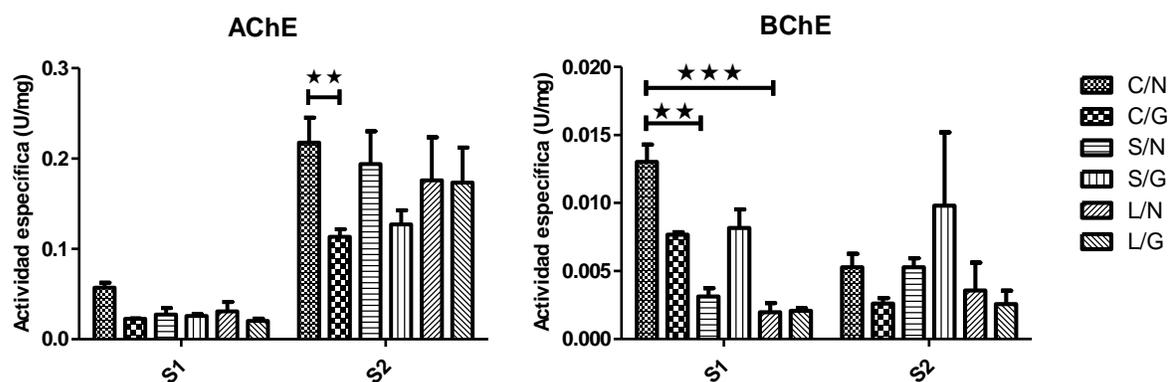


Figura 17. Actividad específica de colinesterasas en hipocampo. Las barras representan el promedio (n=3) de un experimento realizado por triplicado + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. **p<0.01, ***p<0.001. Nótese la diferencia en la escala de las gráficas.

VIII. 8. Determinación de la actividad de colinesterasas en plasma

Los resultados de la actividad colinesterásica en plasma no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos estudiados. Sin embargo, cabe resaltar que los animales control alimentados con la dieta alta en grasa tendieron a presentar una actividad menor, tanto de AChE como de BChE (figura 18), respecto al mismo grupo con dieta normal, poniendo de manifiesto que la alimentación puede influir sobre la actividad de estas enzimas.

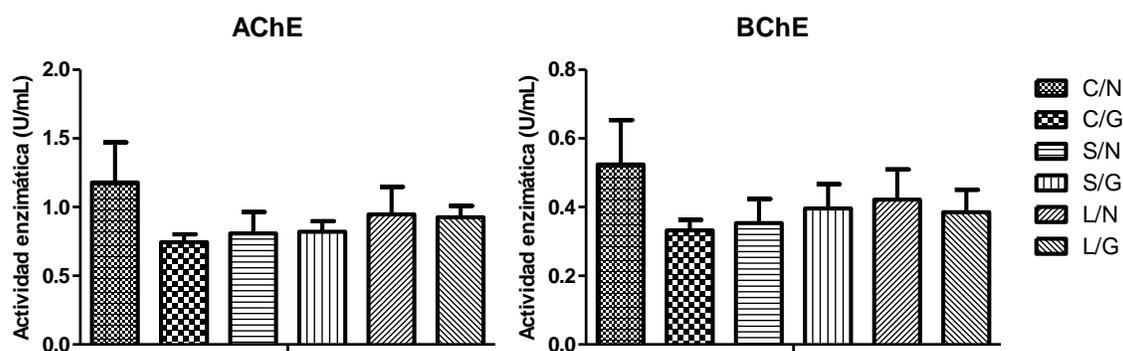


Figura 18. Actividad enzimática de colinesterasas en plasma. Las barras representan el promedio (n=3) de un experimento realizado por triplicado + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. Nótese la diferencia en la escala de las gráficas.

VIII. 9. Determinación de proteínas totales en plasma

Se determinaron las proteínas plasmáticas totales, donde no se mostraron diferencias estadísticamente significativas tras la administración de la colinotoxina, ni por influencia de la dieta (Figura 19).

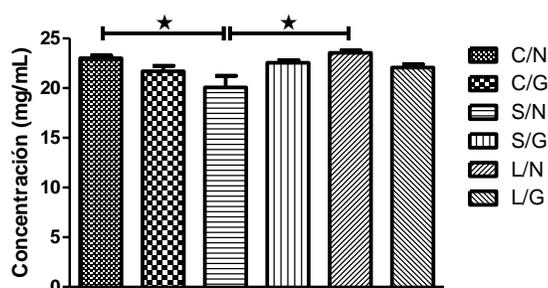


Figura 19. Concentración de proteínas totales en plasma de rata. Las barras representan el promedio (n=3) de un experimento realizado por triplicado + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas.

VIII. 10. Estimación de la actividad específica de colinesterasas plasmáticas

De la misma forma que en el caso de las colinesterasas en hipocampo, se calculó la actividad enzimática específica de AChE y BChE (es decir, U/mg proteína) presente en plasma (Figura 20), hallándose resultados muy similares a los estimados en cuestión de volumen (mililitro) de plasma e igualmente, sin observar significancia estadística entre los grupos.

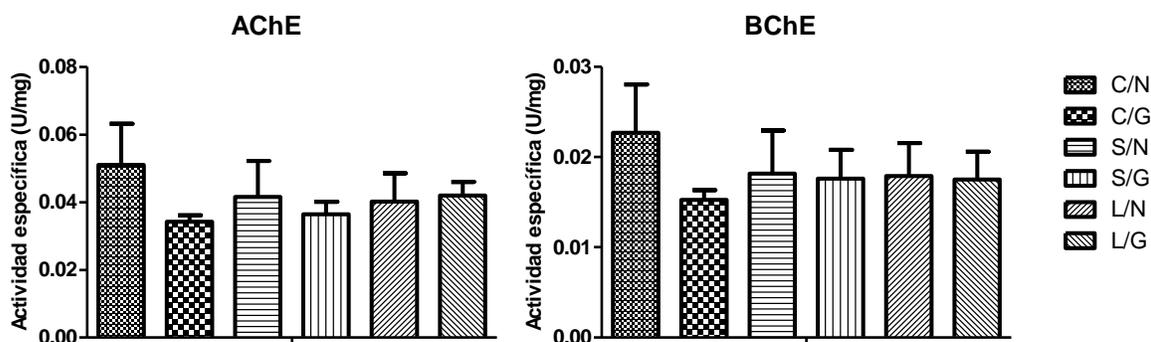


Figura 20. Actividad específica de las colinesterasas en plasma de rata. Las barras representan el promedio (n=3) de un experimento realizado por triplicado + EEM. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. Nótese la diferencia en la escala de las gráficas.

VIII. 11. Análisis de incorporación de carbohidratos por interacción con lectinas

Se analizaron los perfiles de glicosilación de las fracciones de colinesterasas extraídas de hipocampo.

En la figura 21 se puede apreciar que las formas solubles de AChE (las presentes en la fracción S₁) presentaron un mayor porcentaje de interacción con la lectina Con A,

cuando se comparó a los animales lesionados con los controles, aunque tal incremento no resultó ser estadísticamente significativo.

Al comparar el efecto de la dieta en los grupos lesionados, se encontró una disminución significativa en los animales alimentados con dieta alta en grasas. La interacción de AChE con LCA no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

Sin embargo, la interacción con WGA resultó ser significativamente menor en el grupo lesionado al compararlo con la del grupo control, cuando se evaluó la interacción de la fracción S_1 de AChE. Asimismo, la dieta alta en grasas provocó una disminución significativa en la interacción en el grupo control, contrario a la que se observó en la fracción S_2 , donde la interacción de AChE con WGA en los controles con dieta alta en grasa aumentó significativamente.

En el caso de la interacción de BChE con las lectinas resultó evidente la diferencia cuando se evaluó la unión a Con A, hallándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y sham, al compararse con el grupo lesionado, que también presenta diferencias significativas por influencia de la dieta, cuando se analiza la fracción S_1 de la enzima; no se encontró interacción de las formas ancladas a membrana. El análisis de unión a LCA no mostró diferencias estadísticamente significativas. Lo mismo sucede con la interacción de BChE con WGA.

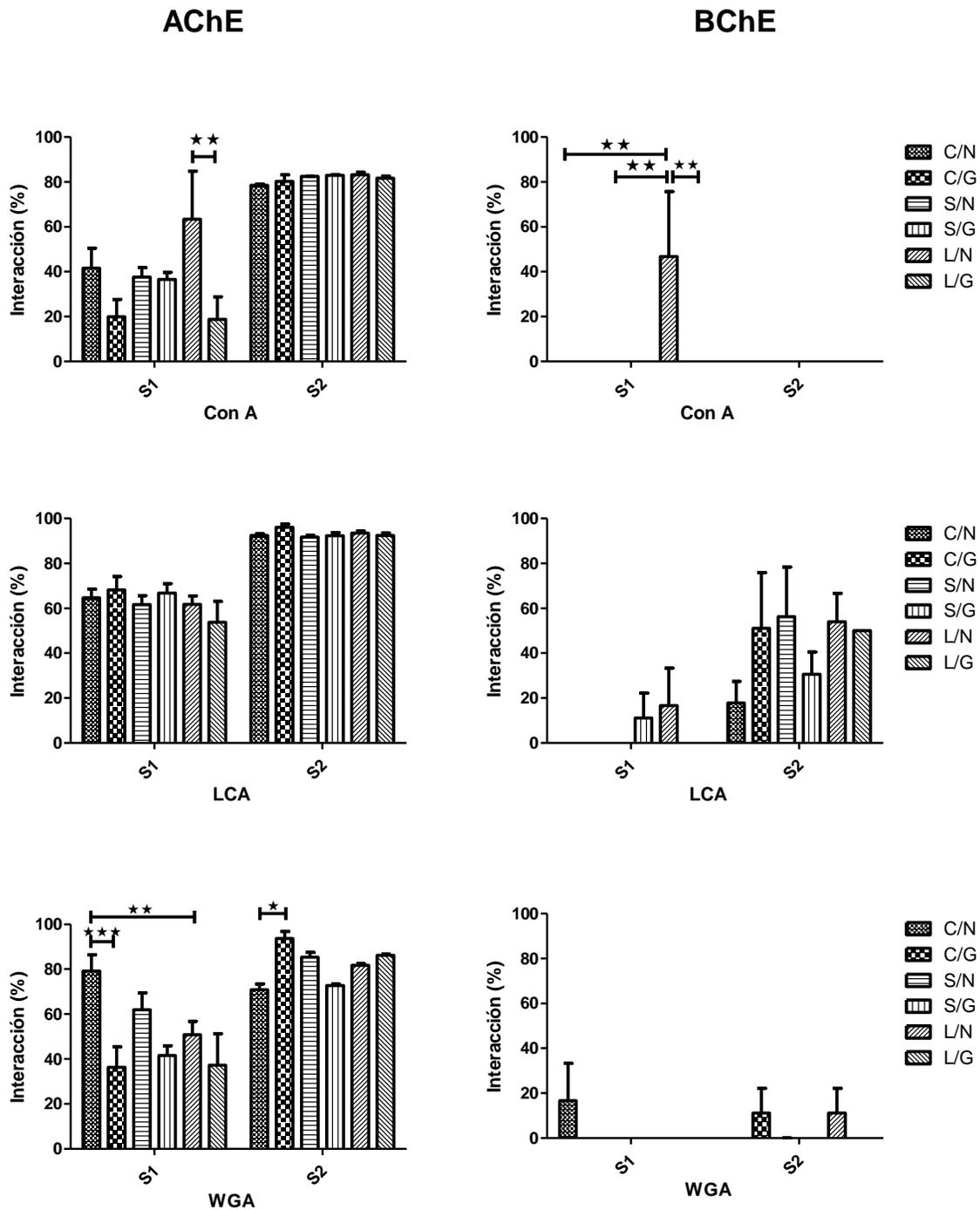


Figura 21. Interacción de colinesterasas de hipocampo con lectinas de diferente especificidad. Las barras representan el promedio (n=3) + EEM de un experimento realizado por triplicado. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La interacción de AChE plasmática con la Con-A mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo sham y el lesionado, así como en el grupo sham con dieta alta en grasa respecto al alimentado con dieta normal. El porcentaje de interacción con la LCA disminuyó significativamente en el grupo control con dieta alta en grasa respecto al alimentado con dieta normal. La interacción con la WGA mostró mayores diferencias, disminuyendo significativamente en los grupos sham y lesionado cuando fueron comparados con el grupo control y aumentando significativamente por efecto de la dieta rica en grasas en el grupo lesionado comparado con el grupo respectivo con dieta normal.

La interacción de BChE con las lectinas usadas en este estudio fue menos reveladora. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con su interacción con la Con-A, ni con la LCA. Por su parte, la unión a WGA resultó significativamente disminuida en el grupo sham respecto al grupo control.

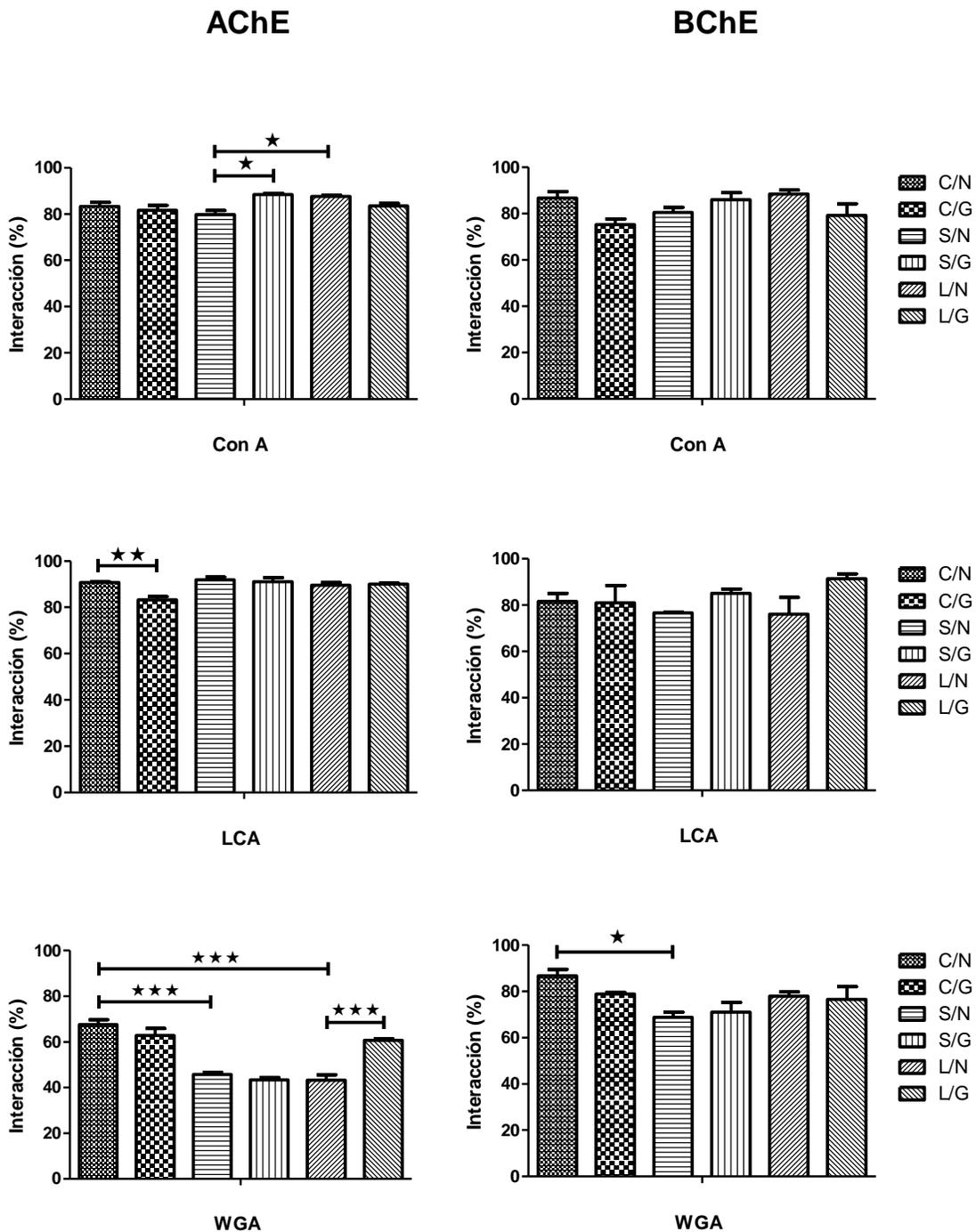


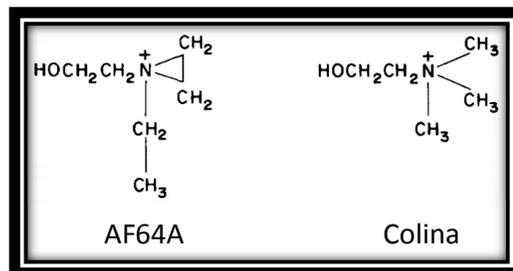
Figura 21. Interacción de colinesterasas de plasma con lectinas de diferente especificidad. Las barras representan el promedio (n=3) + EEM de un experimento realizado por triplicado. C/N: Control con dieta normal, C/G: Control con dieta alta en grasas, S/N: Sham con dieta normal, S/G: Sham con dieta alta en grasas, L/N: Lesionado con dieta normal, L/G: Lesionado con dieta alta en grasas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

IX. DISCUSIÓN

El hipocampo es un núcleo de asociación, en el que convergen conexiones de regiones corticales y subcorticales, por lo que juega un papel importante en los procesos cognitivos. En el hipocampo (como en otras áreas cerebrales) se hallan neuronas colinérgicas que presentan actividad de enzimas implicadas en la síntesis del neurotransmisor ACh, lo que lo hace un blanco de colinotoxinas.

A este respecto, se han desarrollado estrategias experimentales para promover una condición de hipofunción colinérgica, que involucran el empleo de análogos de colina con capacidad neurotóxica. Es el caso del ion azidinio de etilcolina o AF64A (Figura 22), que posee una estructura similar a la colina y contiene en su estructura al ion azidinio, el cual es citotóxico, ya que produce una inhibición irreversible del transportador de alta afinidad de colina (HACHT) y de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), lo que conduce a una disminución en el contenido de ACh (Hanin, 1996).

Figura 22. Estructura de la colinotoxina AF64A y de la colina. El ion aziridinio del AF64A es el que confiere a esta molécula su capacidad neurotóxica.



Así pues, los resultados obtenidos en la evaluación de la memoria y/o aprendizaje en ratas a las que se les administró la neurotoxina colinérgica AF64A, en la región CA1 del hipocampo, se relacionan con una disminución en el contenido del neurotransmisor.

La disfunción de la memoria episódica es el primer y más profundo síntoma en muchos casos de EA. El hipocampo juega un papel clave en la consolidación de nuevas memorias episódicas, y alteraciones en esta estructura probablemente conducen al desarrollo de los primeros síntomas de la enfermedad (Milner, 2005; Braak *et al.*, 2006).

Una serie de evidencias en seres humanos y primates demuestra que el sistema de memoria episódica depende de la integridad funcional de los lóbulos temporales mediales que incluyen al hipocampo y las cortezas entorrinal y perirrinal. Intervienen también muchas otras estructuras, no solo para retener la información, sino para el registro, adquisición, codificación y recuperación de la información, así como en la evaluación de la secuencia temporal y del tiempo transcurrido desde un determinado acontecimiento. Para evaluar este tipo de memoria en ratas, en este estudio se realizó la prueba de reconocimiento de objetos.

La prueba de reconocimiento de objetos aplicada en roedores se basa en la tendencia innata a explorar nuevos objetos más que los familiares (Ennaceur y Delacour, 1988). Aunque existe controversia acerca de las áreas cerebrales involucradas en la memoria de reconocimiento de objetos, numerosos estudios posicionan a la corteza perirrinal como la estructura clave.

Los resultados de esta prueba indican que, efectivamente, los animales lesionados con AF64A, pierden esta memoria (Figura 11). Los animales lesionados, contrariamente a lo que sucede con los animales control y los sham, no presentan

diferencias estadísticamente significativas al comparar un objeto novedoso contra uno presentado previamente, más aún, no exploran el nuevo objeto.

Deficiencias en el reconocimiento de objetos han sido observadas en ratas ancianas (mayores de 20 meses), en las que se considera que ocurre un deterioro en la memoria de trabajo no espacial. El patrón de respuesta característico de las ratas jóvenes es explorar durante más tiempo el objeto nuevo; en las ratas mayores de 20 meses no hay tal diferencia, por lo cual, se infiere que no discriminan entre los objetos nuevos y los familiares, tal como sucede con los animales administrados con la colinotoxina usada en este estudio, concordando con resultados previos que apuntan a que la discriminación de objetos parece depender de la integridad del sistema colinérgico (Bartolini *et al.*, 1996).

Es bien conocido que el hipocampo resulta ser una estructura esencial donde tiene lugar el aprendizaje, especialmente si a aprendizaje espacial se refiere. Hay que mencionar que pacientes con EA exhiben distintos grados de atrofia en este sitio y que si la actividad del hipocampo no está íntegra se producen alteraciones en la percepción espacial, lo que en un paciente significa, por ejemplo, dificultad para encontrar o seguir un camino (Giacobini y Pepeu, 2006).

Para evaluar el aprendizaje espacial en ratas, se hizo uso del laberinto acuático de Morris (Morris, 1984). Existen diversas líneas de evidencia que confirman la utilidad de este modelo para las investigaciones pertinentes en el estudio de enfermedades en donde la cognición se ve deteriorada (Terry, 2009).

La reducción de la actividad colinérgica central en roedores, como resultado de lesiones cerebrales, perjudica el aprendizaje espacial, evaluado en el laberinto acuático de Morris (McNamara y Skelton, 1993). Así lo confirman los resultados obtenidos en el presente estudio (Figura 12), donde los animales con lesión colinérgica en el hipocampo muestran un detrimento estadísticamente significativo en este tipo de aprendizaje tras cuatro sesiones llevadas a cabo en el laberinto, como ya lo demostraron Morris y colaboradores, quienes observaron que ratas con lesiones hipocampales y septohipocampales muestran deficiencias al ser evaluadas en el laberinto acuático (Morris *et al.*, 1982).

En este mismo contexto, en la prueba final de retención (sin plataforma) no se observaron diferencias estadísticamente distinguibles entre grupos (Figura 13), poniendo de manifiesto que, tal como lo describieran McNamara y Skelton (1993), la hipofunción colinérgica impide el aprendizaje espacial pero no el recuerdo.

Otro tipo de cambio en la capacidad cognitiva evaluada en este trabajo fue el condicionamiento aversivo al sabor. El CAS involucra una forma eficiente de condicionamiento, en el que puede desarrollarse una aversión intensa.

En este estudio se empleó un sabor identificable (sacarina) y posteriormente se indujo malestar gastrointestinal (con cloruro de litio) para producir la aversión, observándose que únicamente los animales control aprenden esta clase de condicionamiento. Por otra parte, pese al dolor generado por el cloruro de litio tras la primera exposición a la sacarina, los animales lesionados y los sham continúan

prefiriendo el consumo de esta solución, evidenciando que las lesiones hipocampales pueden afectar el condicionamiento aversivo gustativo (Figura 14).

El aprendizaje aversivo gustativo o la habituación de neofobia gustativa permiten adquirir memorias gustativas aversivas y apetitivas tradicionalmente integradas entre los diversos tipos de memorias no declarativas, que no necesariamente requieren la integridad del sistema hipocampal. La memoria de reconocimiento gustativa depende de un circuito neural que involucra áreas cerebrales situadas en diversos niveles de integración desde el tronco cerebral, diencéfalo y corteza cerebral (Bermudez-Rattoni, 2004).

A pesar de que el hipocampo no parece ser necesario para la adquisición del aprendizaje en el CAS, existe información que sustenta que el efecto de los daños en el hipocampo se hace evidente en ratas adultas. Se ha observado que las lesiones neurotóxicas en las regiones dorsal y ventral del hipocampo alteran selectivamente el aprendizaje a la aversión al sabor cuando se emplea el intervalo de 3 h entre el sabor identificable y el malestar gastrointestinal (Koh *et al.*, 2009). Asimismo, cuando se inactiva al hipocampo de manera selectiva y permanente se presenta interferencia con el fenómeno de aprendizaje a sabores complejos, dependiendo de la experiencia previa (Gallo *et al.*, 1999). Así, los resultados obtenidos podrían sustentarse en las observaciones señaladas.

El sistema de neurotransmisión colinérgica es ampliamente distribuido en el cerebro humano y juega un papel importante en la regulación de diversos procesos, entre los

que se incluyen memoria, aprendizaje, atención y comportamiento (Coyle *et al.*, 1983; Geula, 1999).

Entre las principales características de la EA se encuentra la disfunción del sistema colinérgico (Bartus *et al.*, 1982), cuya funcionalidad normal, como se ha mencionado, depende de la hidrólisis rápida de ACh por ChEs.

La expresión de las ChEs es dependiente de tejido, así, AChE predomina en el músculo y en el sistema nervioso (Marnay y Nachmansohn, 1937; Marnay y Nachmansohn, 1938), en donde está acompañada por una pequeña cantidad de BChE (Chatonnet y Lockridge, 1989; Li y *et al.*, 2000).

La AChE se expresa en niveles particularmente elevados en la formación hipocampal, así como en las áreas motora, pre-motora y neocortical de la corteza cerebral. La BChE también es expresada en hipocampo y neocorteza temporal, pero a niveles menores que la AChE (Mesulam y Geula, 1991; Darvesh *et al.*, 1998; Oda y Nakanishi, 2000). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con tales observaciones, mostrando mayor actividad AChE que BChE en los extractos obtenidos de hipocampo (Figura 17).

Existen varias formas moleculares de AChE, expresadas a partir de un transcrito determinado; la variante AChE-T, localizada principalmente en las sinapsis, se presenta tanto en formas globulares como asimétricas (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008), cuya distinción se basa en la presencia o ausencia de un tallo de tipo colagénico, que puede anclarse a las membranas; de esta forma, no resulta

sorprendente que, en los extractos de hipocampo, se haya encontrado mayor actividad de AChE en la fracción S₂, como se demuestra en la figura 17.

La principal fuente de producción de AChE son las neuronas, mismas que, conforme progresa la EA, van perdiéndose y, por tanto, la producción de AChE va disminuyendo. Por el contrario, la producción de BChE se incrementa como consecuencia de una proliferación anormal de la glía (Giacobini, 2001; Mesulam *et al.*, 2002a; Mesulam *et al.*, 2002b).

Como resultado de la inversión en la proporción AChE/BChE, diversos estudios reportan que la actividad de la AChE disminuye consistentemente en ciertas regiones del cerebro de pacientes con EA, mientras que la actividad de la BChE, incrementa o no cambia (Davies y Maloney, 1976; Perry *et al.*, 1977; Perry *et al.*, 1978; Ciro *et al.*, 2012).

Respecto a cuáles son las formas moleculares de las ChEs que se encuentran alteradas en la EA, se sabe que, a medida que progresa la enfermedad, hay un aumento en la forma G₁ de ambas ChEs y una disminución en la forma G₄ de la AChE, particularmente en el hipocampo y amígdala. Se ha informado también de una disminución en la forma G₄ unida a la membrana de la AChE en un 71%, 45% y 47% en la corteza frontal, la corteza parietal, y el caudado putamen, respectivamente, y una disminución en las formas solubles G₁, G₂, y G₄ de AChE en el caudado putamen (sin cambios en la corteza frontal y parietal) en pacientes con EA en comparación con los controles (Nordberg *et al.*, 2013).

Sin embargo, en el presente trabajo no fue posible observar el comportamiento típico de las ChEs en el cerebro con déficit colinérgico. La lesión colinérgica generada en el hipocampo por efecto de la administración de la colinotoxina AF64A no indujo cambios estadísticamente significativos en la actividad de la AChE en ninguna de las fracciones de los extractos hipocampales, pudiendo sugerir algún mecanismo adaptativo en respuesta al déficit de ACh. La actividad en la fracción S₁ de la BChE, en cambio, mostró una disminución estadísticamente significativa en los animales tratados con AF64A (Figura 17).

Se ha realizado un gran número de investigaciones, encaminadas a la búsqueda de alteraciones en los niveles de ChEs en sangre como consecuencia de procesos patológicos y el caso de la EA no ha sido la excepción.

Si bien, el líquido cefalorraquídeo (LCR) resultaría ser una fuente más pertinente para examinar marcadores de diagnóstico para la EA, el plasma ofrece la gran ventaja de la fácil accesibilidad para su uso clínico en el seguimiento de la enfermedad (García-Ayllón *et al.*, 2010).

La respuesta inflamatoria producida en el cerebro a causa de la EA puede afectar los niveles periféricos de las ChEs, vía el sistema colinérgico periférico (Alkalay *et al.*, 2013). Así, las ChEs en plasma podrían tener gran potencial como indicadores del progreso y pronóstico de la enfermedad.

García-Ayllón y colaboradores (2010) detectaron un incremento de la actividad de AChE en plasma de pacientes con EA comparado con los controles sanos,

emparejados por género y edad, mismo que correlaciona con un incremento en las formas $G_1 + G_2$ -el subconjunto que se sabe incrementado en cerebro de pacientes con la EA- y una disminución de las formas G_4 .

No obstante, la lesión colinérgica inducida por la administración intrahipocampal de AF64A no mostró tener repercusiones a nivel periférico, es decir, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos cuando se estimó la actividad de las ChEs en plasma (Figura 20).

Probablemente, la AChE plasmática tiene múltiples orígenes celulares, incluyendo las células del cerebro, entre otras. Por lo tanto, se puede suponer que el incremento observado en el plasma de pacientes con EA puede estar asociado especialmente con el aumento de las especies ligeras de AChE, característico del cerebro de paciente con la EA (Arendt *et al.*, 1992; Sáez-Valero *et al.*, 1999). Esto justificaría que no se encontró un aumento significativo en la actividad de AChE en plasma, ya que tampoco fue observado tal incremento en las fracciones solubilizadas de hipocampo.

Por otra parte, la BChE plasmática es originada en las células hepáticas y un aumento en su actividad puede ser indicativo de obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico o DM (Santarpia *et al.*, 2013).

Algunos investigadores han encontrado relaciones significativas entre la actividad de la BChE y los niveles séricos de triacilglicéridos, colesterol, colesterol-HDL y colesterol-LDL en ayuno (Annapurna *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 1993; Kutty y Payne,

1994; Rustemeijer *et al.*, 2001; Alcántara *et al.*, 2005; Randell *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2006). Adicionalmente, la actividad de esta enzima se ha asociado con las actividades de las enzimas: transaminasa glutámico pirúvica, transaminasa glutámico oxalacética, y gamma glutamil transpeptidasa, las cuales se ven incrementadas en estados de resistencia a insulina (Cucuianu *et al.*, 2002).

En el presente trabajo, las concentraciones séricas de triacilglicéridos, colesterol, colesterol-HDL y la actividad de las transaminasas evaluadas (Figura 9), así como la actividad de la BChE (Figura 20), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos examinados, por lo que podemos inferir que ninguno de los grupos presenta alteraciones metabólicas.

Otro aspecto abordado en este estudio es el referente al procesamiento post-traducciona l de las ChEs. Las modificaciones post-traduccionales juegan un papel clave para modular la actividad y la función de la mayoría de las proteínas en los sistemas biológicos (Hann, 2006). La glicosilación representa la forma más común y compleja.

A menudo, una glicoproteína contiene más de un sitio de unión de oligosacáridos (sitio potencial) y cada sitio de glicosilación puede ser modificado con múltiples cadenas de oligosacáridos. Conjuntamente, en una sola glicoproteína, la estructura del oligosacárido en cada sitio puede ser significativamente diferente. Además, las estructuras de los glicanos se pueden modificar fácilmente por cambios en las

condiciones fisiológicas de las células (Lowe y Marth, 2003; Haltiwanger y Lowe, 2004).

Una de las funciones primordiales de la glicosilación de una proteína dada es dirigir a la proteína a la ubicación subcelular apropiada (Kaplan *et al.*, 1977; Varki y Kornfeld, 1980). Adicionalmente, la glicosilación ha sido implicada en numerosos procesos biológicos, incluyendo el crecimiento celular y el desarrollo, la respuesta inmune, el crecimiento tumoral, la metástasis, la anticoagulación, la comunicación célula-célula y la patogénesis microbiana (Sasisekharan *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2003; Inatani *et al.*, 2003; Lowe y Marth, 2003; Collins y Paulson, 2004; Casu *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004; Lin, 2004; Dube y Bertozzi, 2005; Kinjo *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005). Además, se reconoce que la glicosilación aberrante de proteínas desempeña un papel importante en los trastornos humanos, incluyendo a las enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Liu *et al.*, 2002; Saez-Valero *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2010).

Entre las proteínas cuya glicosilación parece ser importante en la progresión de la EA se encuentran las ChEs. A este respecto, Sáez-Valero y colaboradores han reportado que la glicosilación de la AChE se encuentra alterada en cerebro y LCR post-mortem de pacientes con la EA. La glicosilación de la BChE, también parece estar alterada en el LCR (Sáez-Valero *et al.*, 1999; Sáez-Valero *et al.*, 2000; Sáez-Valero y Small, 2001).

Al analizar la interacción de colinesterasas extraídas de hipocampo con lectinas, se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas sobre la interacción de AChE con la aglutinina Con A en los animales administrados con la colinotoxina respecto a los controles, es decir, la incorporación de residuos de manosa, no se ve alterada, lo mismo que la incorporación de manosa asociada a centros de fucosa (evaluada por la interacción con LCA). Sin embargo, la interacción de AChE con WGA resultó ser significativamente menor en el grupo lesionado al compararlo con el control, revelando una incorporación anómala de ácido siálico o N-acetilglucosamina (Figura 21).

Estudios anteriores revelaron cambios en la glicosilación de AChE en LCR, colectado *ante-mortem*, de pacientes con EA, en los que el porcentaje de interacción de AChE con Con A disminuyó significativamente, contrariamente a lo que sucedió con los controles. La disminución observada fue atribuida al aumento de las concentraciones de las formas G₂ y G₁, que no son reconocidos por la Con A. No obstante, el cambio en la glicosilación de la AChE parece ser específica para la EA, porque no se observa en otras enfermedades neurológicas, aún en otros tipos de demencia (Sáez-Valero *et al.*, 2000). Esto último explicaría los resultados aquí encontrados, aunado a que la glicosilación es especie-específica y asimismo, específica de la célula que la sintetiza.

La interacción de BChE con Con A aumentó significativamente en los animales lesionados respecto a los controles y sham, es decir la lesión colinérgica incrementa la manosilación de la BChE. No se encontraron diferencias estadísticamente

significativas en la interacción de esta enzima con las lectinas LCA y WGA (Figura 21). Por el contrario, Sáez-Valero y Small (2001) reportaron que el porcentaje de interacción de BChE con Con A disminuyó en el grupo de pacientes con la EA, respecto a los controles y a los grupos cuyos participantes presentaron otras enfermedades neurológicas y, en contraste con los resultados para la Con A, la BChE de LCR interacciona fuertemente con WGA.

Respecto a la interacción de colinesterasas de plasma con las lectinas, los resultados de la AChE son muy similares a los encontrados con la enzima extraída de hipocampo, hallando diferencias significativas al interaccionar con WGA, cuyo porcentaje de interacción disminuye significativamente en los grupos sham y lesionado cuando fueron comparados con el grupo control. A diferencia de lo que se observó en hipocampo la interacción con Con A mostró ser diferente entre el grupo sham y el lesionado. Por su parte, la unión a WGA resultó significativamente disminuida en el grupo sham respecto al grupo control (Figura 22).

Ahora bien, sobre el efecto de la dieta alta en grasas sobre las pruebas realizadas en este estudio, cabe señalar que existen reportes que indican que el aumento en el consumo de éste tipo de dietas (que ha de mencionarse, incrementó significativamente sobre las pasadas décadas), se ha relacionado con deficiencias cognitivas (Crichton *et al.*, 2010), aunque son pocos los reportes en donde se examinan las consecuencias del consumo de grasa en la dieta sobre el comportamiento en animales.

Algunos estudios muestran que el consumo crónico de una dieta alta en grasas puede causar déficits en la memoria y el aprendizaje en ratones adultos (Greenwood y Winocur, 2005; Winocur *et al.*, 2005; Valladolid-Acebes *et al.*, 2010).

Asimismo, Morganstern y colaboradores (2012) proporcionaron evidencia que sugiere que el consumo de grasa a corto plazo puede contribuir a la generación de patrones anormales en el comportamiento, posiblemente por estimulación de la neurotransmisión colinérgica nicotínica en regiones hipotalámicas y extrahipotalámicas del cerebro.

En este sentido, el hecho de que los animales sham alimentados con dieta alta en grasas no tuvieron un buen desempeño en la prueba de reconocimiento de objetos (Figura 11), mostraron un deterioro del aprendizaje espacial, evaluado en el laberinto acuático de Morris (Figura 12) y no se condicionaron ante un sabor aversivo (Figura 14) podría indicar que una dieta rica en grasas puede potenciar o agilizar el deterioro cognitivo. En los animales administrados con la neurotoxina colinérgica, AF64A, no pudo discriminarse la influencia de la dieta, ya que aún con la dieta normal, estos animales mostraron un claro decaimiento de la función cognitiva.

Otro efecto observado por el consumo de una dieta alta en grasas es el concerniente a la actividad de las ChEs. La actividad de la AChE de hipocampo (particularmente de la fracción S₂), mostró disminuir significativamente en el grupo control alimentado con dieta alta en grasas respecto al correspondiente con dieta normal, de igual manera, la actividad decayó en el grupo sham aunque la diferencia no fue

estadísticamente significativa; no se encontraron diferencias en los animales lesionados (Figura 17). Si bien no hubo significancia estadística, la actividad de la BChE también disminuyó en los controles que se mantuvieron bajo una dieta rica en grasas frente a los controles con dieta normal; la actividad no cambió en los lesionados y contrariamente a lo sucedido con la actividad de la AChE, la actividad de la BChE incrementó en el grupo sham (Figura 17).

En el plasma, la actividad de las ChEs reveló un comportamiento muy similar, tendiendo a disminuir la actividad de AChE y BChE en los controles sometidos a una dieta alta en grasa respecto a aquellos con dieta normal; aunque menos acentuado, esta tendencia también logra observarse en los animales sham pero no en los lesionados (Figura 20), pudiendo reflejar los hallazgos encontrados en el hipocampo.

Estudios anteriores demostraron que en ratas *Sprague Dawley* que consumieron una dieta alta en grasas durante 7 días, se redujo notablemente la actividad de la AChE en la corteza frontal, el hipotálamo, el área del cerebro medio y el cerebelo, siendo el cambio más pronunciado, en la corteza frontal. Cabe señalar que las ratas que consumieron la dieta alta en grasa en comparación con las ratas mantenidas con dieta Chow, fueron similares en el peso corporal (tal como los animales evaluados en el presente trabajo), consumieron un número equivalente de calorías, pero mostraron un considerable aumento de ácidos grasos libres (Morganstern *et al.*, 2012).

Así pues, un mecanismo posible en la mediación de los efectos del consumo de grasas sobre la función colinérgica puede estar relacionado con la circulación de moléculas energéticas, tales como los ácidos grasos libres. Se ha demostrado que estos metabolitos reducen la actividad *in vitro* de la AChE (Tel *et al.*, 2010; Vajreswari *et al.*, 2002).

Normalmente, la reducción de la actividad de la AChE se ha asociado con el aumento en el contenido de ACh en la hendidura sináptica (Hartmann *et al.*, 2007), así, los niveles de ACh pueden ser potenciados en áreas cerebrales específicas, en ratas que ingieren una dieta alta en grasas; de esta forma resulta lógico que los animales a los que se les administró AF64A, el cual induce una hipofunción colinérgica, reduciendo así los niveles de ACh, no mostraran cambios en la actividad de las ChEs tras someterlos a una dieta elevada en grasas (Figura 17).

La dieta alta en grasas también mostró ser capaz de alterar los patrones de glicosilación de las ChEs. La interacción con Con A de la AChE presente en la fracción S₁ de los extractos de hipocampo disminuyó significativamente en los animales lesionados que consumieron una dieta alta en grasas respecto a los que consumieron una dieta normal, lo mismo sucedió en el caso de la BChE. Otro cambio observado fue en la interacción de la AChE presente en la fracción S₁, con WGA, que en todos los grupos que consumieron dieta alta en grasas disminuyó respecto al correspondiente grupo con dieta normal, aunque tal diferencia resultó significativa sólo en el grupo control, que contrariamente, en la fracción S₂ incrementó significativamente (Figura 21).

La glicosilación de la BChE plasmática no se vio afectada por el consumo de grasas. No obstante, el porcentaje de interacción de AChE con LCA disminuyó significativamente en los controles con dieta alta en grasas frente al grupo control alimentado con dieta normal. La interacción de AChE con WGA incrementó significativamente en los animales lesionados por efecto de la dieta alta en grasas (Figura 22).

X. CONCLUSIONES

- La lesión colinérgica en el hipocampo de ratas altera el metabolismo de la glucosa.
- La lesión colinérgica en el hipocampo de ratas induce el deterioro del aprendizaje y de la memoria, evaluados mediante la tarea de reconocimiento de objetos, el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris y el condicionamiento aversivo al sabor.
- La lesión colinérgica en el hipocampo de ratas reduce la actividad de la BChE de hipocampo.
- La lesión colinérgica en el hipocampo de ratas altera los patrones de glicosilación de las colinesterasas, incrementando la incorporación de manosas a la BChE de hipocampo y disminuyendo la incorporación de ácido siálico/N-acetil glucosamina de la AChE plasmática y de hipocampo.
- El consumo de una dieta alta en grasas acelera el deterioro cognitivo en ratas.
- El consumo de una dieta alta en grasas modifica los patrones de glicosilación de las colinesterasas de hipocampo y plasma, tanto en animales control como en lesionados.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Olukoga AO, Gordon C, Arrol S, Bhatnagar D, Boulton AJ, Durrington PN. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*. 1993; 85: 77-81.
- Alcantara VM, Oliveira LC, Rea RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43: 285-288.
- Alkalay A, Rabinovici GD, Zimmerman G, Agarwal N, Kaufer D, Miller BL, Jagust WJ, Soreq H. Plasma acetylcholinesterase activity correlates with intracerebral β -amyloid load. *Curr Alzheimer Res*. 2013; 10: 48–56.
- Annapurna V, Senciall I, Davis AJ, Kutty KM. Relationship between serum pseudochoolinesterase and triglycerides in experimentally induced diabetes mellitus in rats. *Diabetologia*. 1991; 34:320-324.
- APA (American Psychiatric Association). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR, Washington, DC: American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV, 2000.
- Arendt T, Brückner MK, Lange M, Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development –a study of molecular forms. *Neurochem Int*. 1992. 21: 381-396.
- Ashe K, Aguzzi A. Prions, prionoids and pathogenic proteins in Alzheimer disease. *Prion*. 2013; 7: 55-59.

- Awad N, Gagnon M, Messier C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2004; 26:1044-1080.
- Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 53:277-283.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 1982; 217:408-414.
- Bermudez-Rattoni F. Molecular mechanism of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5: 209-217.
- Bigbee JW, Sharma KV, Chan EL, Bogler O. Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 2000; 861: 354-362.
- Bigbee JW, Sharma KV. The adhesive role of acetylcholinesterase (AChE): detection of AChE binding proteins in developing rat spinal cord. *Neurochem.Res.* 2004; 29: 2043-2050.
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006; 112: 389-404.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

- Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2005; 28:726-735.
- Byers DM, Irwin LN, Moss DE, Sumaya IC, Hohmann CF. Prenatal exposure to the acetylcholinesterase inhibitor methanesulfonyl fluoride alter forebrain morphology and gene expression. *Brain Res*. 2005; 158: 13-22.
- Cabezas-Herrera J, Campoy FJ, Vidal CJ. Amphiphilic properties of molecular forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic muscle. *J Neurosci Res*. 1994; 38: 505-514
- Campos-Peña V, Meraz Ríos MA. Marcadores moleculares de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Mex Neurosci*. 2006; 7(4): 293-299.
- Campoy FJ. Formas moleculares de acetilcolinesterasa de fracciones microsomales de músculo esquelético. Diferencias en su glicosilación e interacción con anticuerpos. Tesis doctoral. 1992. Universidad de Murcia, Murcia.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer Disease. *Dis Mon*. 2010; 56(9): 484–546.
- Casu B, Guerrini M, Torri G. Structural and conformational aspects of the anticoagulant and antithrombotic activity of heparin and dermatan sulfate. *Curr Pharm Des*. 2004; 10: 939-949.
- Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*. 1989; 260: 625-634.

- Ciro A, Park J, Burkhard G, Yan N, Geula Ch. Biochemical differentiation of cholinesterases from normal and Alzheimer's disease cortex. *Curr Alzheimer Res.* 2012; 9:138-143.
- Çokuğraş AN. Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. *Turk J Biochem.* 2003; 28: 54-61.
- Collins BE, Paulson JC. Cell surface biology mediated by low affinity multivalent protein-glycan interactions. *Curr Opin Chem Biol.* 2004; 8: 617-625.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 1983; 219:1184-1190.
- Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(R1): R12-20.
- Crichton GE, Murphy KJ, Bryan J. Dairy intake and cognitive health in middle-aged South Australians. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2010; 19: 161-171.
- Cucuianu M, Nistor T, Hâncu N, Orbai P, Muscurel C, Stoian I. Serum cholinesterase activity correlates with serum insulin, C peptide and free fatty acids levels in patients with type 2 diabetes. *Rom J Intern Med.* 2002; 40: 43-51.
- Darvesh S, Grantham DL, Hopkins DA. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 1998; 393: 378-390.
- Davis P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1976; 2: 1403

- Deutsch VR, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, Grant A, Eldor A, Soreq H. The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp.Hematol.* 2002; 30: 1153-1161.
- Dori A, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb. Cortex.* 2005; 15: 419-430.
- Dori A. Soreq H. Neuromuscular therapeutics by RNA-targeted suppression of ACHE gene expression. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006; 1082: 77-90.
- Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 477-488.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7:88-95
- Enaceur A, Dalacour J. A new one-trial test for neurological studies of memory in rats: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988; 31: 47-59.
- Erol A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *J Alzh Dis.* 2008; 13(3): 241-253.
- Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells In the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2008; 3: 762-780.

- Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284: R882-892.
- Fukui H, Moraes CT. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegenerative connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci.* 2008; 31(5): 251-256.
- Gallo M, Ballesteros MA, Molero A, Morón I. Taste aversión learning as a tool for the study of hippocampal and no-hippocampal brain memory circuits regulating diet selection. *Nutr Neurosci.* 1999; 2: 277-302.
- Gao Q, Horvath TL. Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci.* 2007; 30: 367-398.
- García-Ayllón MS, Riba-Llena I, Serra-Basante C, Alom J, Boopathy R, Sáez-Valero J. Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma. *PLoS One.* 2010; 5: e8701.
- Gazulla J. Cavero-Nagore M. glutamate and Alzheimer's disease. *Rev Neurol.* 2006; 42: 427-432.
- Geldmacher DS. Whitehouse PJ. Evaluation of dementia. *N Engl J Med.* 1996; 335: 330-336.
- Geula C. Abnormalities of neural circuitry in Alzheimer's disease: hippocampus and cortical cholinergic innervation. *Neurology.* 1998; 51:S18-S29.
- Giacobini E, Pepeu G. The brain cholinergic system in health and disease. Informa health care. UK 2006.

- Giacobini E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs Aging*. 2001; 18: 891-898.
- Gilman S. Alzheimer's disease. *Perspect Biol Med*. 1997; 40:230-245.
- Götz J, Ittner LM, Lim YA. Common features between diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:1321-1325.
- Greenwood CE, Winocur G. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol Aging*. 2005; 26: 42-45.
- Grisaru D, Pick M, Perry C, Ella H, Sklan EH, Almog R, Goldberg I, Naparstek E, Lessing JB, Soreq H. y Deutsch V. Hydrolytic and nonenzymatic functions of acetylcholinesterase comodulate hemopoietic stress responses. *J Immunol* 2006; 176: 27-35.
- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*. 1999; 264: 672-686.
- Gu Y, Nieves JW, Stern Y, Luchsinger JA, Scarmeas N. Food combination and Alzheimer disease risk: A protective diet. *Arch Neurol*. 2010; 67:699-706.
- Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O, Taylor ME, Weis WI, Drickamer K. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 11: 591-598.
- Haltiwanger RS, Lowe JB. Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 491-537.

- Hanin I. The AF64A model of cholinergic hypofunction: an update. *Life Sci.* 1996; 58: 1955-1964.
- Hann SR. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16: 288-302.
- Hartmann J, Kiewert C, Duysen EG, Lockridge O, Greig NH, Klein J. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. *J Neurochem.* 2007; 100: 1421-1429.
- Henderson VW. Action of estrogens in the aging brain. Dementia and cognitive aging. *Biochem Biophys Acta.* 2009.
- Herholz K, Weisenbach S, Kalbe E. Deficits of the cholinergic system in early AD. *Neuropsychologia.* 2008; 46(6):1642-1647.
- Hwang H, Zhang J, Chung KA, Leverenz JB, Zabetian CP, Peskind ER, Jankovic J, Su Z, Hancock AM, Pan C, Montine TJ, Pan S, Nutt J, Albin R, Gearing M, Beyer RP, Shi M, Zhang J. Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. *Mass Spectrom Rev.* 2010; 29: 79-125.
- Hwang HY, Olson SK, Esko JD, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis and vulval morphogenesis require chondroitin biosynthesis. *Nature.* 2003; 423: 439-443.
- Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y. Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science.* 2003; 302: 1044-1046.

- Inouye SK, Studenski S, Tinetti ME, Kuchel GA. Geriatric Syndromes: Clinical, Research and Policy Implications of a Core Geriatric Concept. *J Am Geriatr Soc.* 2007; 55: 780-791.
- Irving GF, Freund LY, Eriksdotter JM, Basun H, Brismar K, Hjorth. Omega 3-fatty acid supplementation effects on weight and appetite in patients with Alzheimer's disease: the omega 3 Alzheimer's disease study. *J.Am Geriatr Soc.* 2009; 57(1): 11-17.
- Jayadev S, Nochlin D, Poorkaj P, Steinbart EJ, Mastrianni JA, Montine TJ, Ghetti B, Schellenberg GD, Bird TD, Leverenz JB. Familial prion disease with Alzheimer Disease-like Tau pathology and clinical phenotype. *Ann Neurol.* 2011; 69: 712-720.
- Johansen A, Nielsen EM, Andersen G, Hamid YH, Jensen DP, Glümer C, Drivsholm T, Borch-Johansen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Large-scale studies of the functional K variant of the butyrylcholinesterase gene in relation to Type 2 diabetes and insulin secretion. *Diabetologia.* 2004; 47:1437-1441.
- Jolivald CG, Hurford R, Lee CA, Dumaop W, Rockenstein E, Masliah E.. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Exp Neurol.* 2010; 223:422-431.
- Kaplan A, Achord DT, Sly WS. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 2026-2030.

- Katz B. Nerve, muscle and synapse. McGraw Hill, New York. 1966.
- Kawas CH. Clinical practice. Early Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1056-1063.
- Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara K, Wong CH, Kronenberg M. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature.* 2005; 434:520-525.
- Koh MT, Wheeler DS, Gallagher M. Hippocampal lesions interfere with long-trace taste aversion conditioning. *Physiol Behav.* 2009; 98: 103-107.
- Krnic Z, Bradamante V. Effects of oxprenolol treatment on pseudo-cholinesterase and lipids in rats. *Arzneimittelforschung.* 1997; 47:910-913.
- Kutty KM, Huang SN, Kean KT. Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice. *Experimentia.* 1981; 37:1141-1142
- Kutty KM, Payne RH. Serum pseudocholinesterase and very-low density lipoprotein metabolism. *J Clin Lab Anal.* 1994; 8: 247-250.
- Lam CK, Chari M, Lam TK. CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 2009; 24: 159-170.
- Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen R, O'Brien PC, Palumbo PJ: Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol.* 1997; 145:301-308.
- Lev-Lehman E, Deutsch V, Eldor A, Soreq H. Immature human megakaryocytes produce nuclear-associated acetylcholinesterase. *Blood.* 1997; 89: 3644-3653.

- Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem.* 2000; 75: 1320-1331.
- Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review. *Brain Res Rev.* 2007; 56:384-402.
- Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development.* 2004; 131: 6009-6021.
- Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong CX. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 2002; 512: 101-106.
- Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 643-691.
- Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, Shea S, Mayeux R: Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am J Epidemiol.* 2001; 154:635-641.
- Marnay A, Nachmansohn D. Choline esterase in voluntary muscle. *J Physiol.* 1938; 92: 37-47.
- Marnay A, Nachmansohn D. Cholinesterase in voluntary frog's muscle. *J Physiol.* 1937; 89: 359-367.
- Masoro EJ, Austad SN. Handbook of the biology of aging, Amsterdam/Boston: Elsevier Academic Press. 2006.

- Massoulié J, Bon S, Perrier N, Falasca C. The C terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact.* 2005;157-158:3-14
- McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Rev.* 1993; 18: 33-49.
- Mejía-Arango S, Miguel-Jaimes A, Villa A, Ruiz-Arregui L, Gutiérrez-Robledo LM. Deterioro cognoscitivo y factores asociados en adultos mayores en México. *Salud Publica Mex.* 2007; 49: S475-S481.
- Mesulam MM, Geula C. Acetylcholinesterase-rich neurons of the human cerebral cortex: cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distribution. *J Comp Neurol.* 1991; 306:193-220.
- Mesulam MM, Guillozet PA, Shaw A, Levey EG, Duysen G, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience.* 2002a; 110: 627-639.
- Mesulam MM, Guillozet PA, Shaw P, Quinn P. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in de normal and Alzheimer brain. *Neurobiol Dis.* 2002b; 9: 88-93.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 36-46.
- Milner B. The medial temporal-lobe amnesic syndrome. *Psychiatr. Clin. North Am.* 2005; 28: 599-611.

- Mizuno T. The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimer's Dis.* 2012; 2012: 737846-737855.
- Morganstern I, Ye Z, Liang S, Fagan S, Leibowitz SF. Involvement of cholinergic mechanisms in the behavioral effects of dietary fat consumption. *Brain Res.* 2012; 1470: 24-34.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11:47-60.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297:681-683.
- Nachmansohn D, Naumann E Chemical and molecular basis of nerve activity. Academic Press, New York.1975.
- Nordberg A, Ballard C, Bullock R, Darreh-Shori T, Somogyi M. A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. *Prim Care Companion CNS Disord.* 2013; 15: PCC.12r01412.
- Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson disease. *CNS Neurol Disord drug target.* 2007; 6(6):411-423.
- Oda Y, Nakanishi I. The distribution of cholinergic neurons in the human central nervous system. *Histol Histopathol.* 2000; 15: 825-834.
- Paoletti F, Mocali A, Vannucchi AM, Acetylcholinesterase in murine erythroleukemia (Friend) cells: evidence for megakaryocyte-like expression and potential growth-regulatory role of enzyme activity. *Blood.* 1992; 79: 2873-2879.

- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th Edition. London, UK: Academic Press. 1998.
- Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med.* 2010; 77(1): 32-42.
- Perrier NA, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulié J. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J.Neurochem.* 2005; 94: 629-638.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1978; 4: 273-277.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet.* 1977; 1: 189.
- Petersen RC. Mild cognitive impairment: aging to Alzheimer's disease. Oxford/Nueva York: Oxford University Press. 2003.
- Qiu CX, Winblad B, Fratiglioni L: Risk factors for dementia and Alzheimer's disease – findings from a community-based cohort study in Stockholm, Sweden. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2005; 26:882-887.
- Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem.* 2005; 38: 799-805.

- Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem.* 2005; 38:799-805
- Rao AA, Sridhar RG, Das NU. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med. Hypot.* 2007; 69:1272-1276.
- Raygani AV, Zahrai M, Soltanzadeh A, Doosti M, Javadi E, Pourmotabbed T. Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2004; 371:142-146.
- Rojo LE, Fernández JA, Maccioni AA, Jiménez JM, Maccioni RB. Neuroinflammation: Implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of medical research.* 2008; 39: 1-16.
- Rosenberry TL. Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase. *Biophys. J.* 1979; 26: 263-290.
- Rotundo RL. Acetylcholinesterase biosynthesis and transport in tissue culture. En: *Methods in Enzymology.* Editores: Colowick SP, Kaplan NO. Academic Press, New York. 1983; Vol 96, Parte J: 353-367.
- Rustemeijer C, Schouten JA, Voerman HJ, Beynen AC, Donker AJ, Heine RJ. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in type II diabetes mellitus? *Clin Sci (Lond).* 2001; 101: 29-35.

- Saez-Valero J, Barquero MS, Marcos A, McLean CA, Small DH. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in lumbar cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000; 69: 664-667.
- Saez-Valero J, Fodero LR, Sjogren M, Andreasen N, Amici S, Gallai V, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Parnetti L, Blennow K, Small DH. Glycosylation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase changes as a function of the duration of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2003; 72: 520-526.
- Saez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Small DH. Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1999; 72: 1600-1608.
- Saez-Valero J, Small DH. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase glycoforms are biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2001; 3: 323-328.
- Sáez-Valero J, Small DH. Altered glycosylation of cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2001; 889:247-250.
- Sánchez-Chávez G, Salceda R. Acetyl- and butyrylcholinesterase molecular forms in normal and streptozotocin-diabetic rat retinal pigment epithelium. *Neurochem Inter*. 2001; 39:209-215.
- Sánchez-Chávez G, Salceda R. Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina. *IUBMB. Life*. 2000; 49:283-287.

- Sánchez-Chávez G, Salceda R. Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *REB*. 2008; 22: 44-51.
- Santarpia L, Grandone I, Contaldo F, Pasanisi F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013; 4:31-39.
- Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 521-528.
- Sharma S, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, Sengupta S. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids in Health Dis*. 2006; 5:1-10.
- Sims-Robinson C, Kim B, Rosko A, Feldman EL. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat Rev Neurol*. 2010; 6:551-559.
- Solís H, López-Hernández E. Neuroanatomía funcional de la memoria. *Arch Neurocién*. 2009; 14(3):176-187.
- Soreq H, Ben-Aziz R, Prody CA, Seidman S, Gnatt A, Neville L, Lieman-Hurwitz, J, Lev-Lehman E, Ginzberg D, Lipidot-Lifson Y, Zakut H. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990; 87: 9688-9692.
- Soreq H, Seidman S, Acetylcholinesterase--new roles for an old actor, *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2: 294-302.

- Soreq, H., Seidman, S., Dreyfus, P.A., Zevin-Sonkin, D. y Zakut, H. Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholine esterase in microinjected *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 10608-10613.
- Squire LR: Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 82:171-177.
- Sridhar GR, Nirmala G. Inborn errors in lipid metabolism. In Lipid disorders. Edited by: Tripathy BB, Das S. Association of Physicians of India, API College of Physicians. 2002; 59-80.
- Sridhar GR, Thota H, Allam AR, Suresh Babu C, Siva Prasad A, Divakar Ch. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: the cholinesterase connection? *Lipids in Health Dis.* 2006; 11:5-28
- Stefanello FM, Franzon R, Tagliari B, Wannmacher C, Wajner M, Wyse AT. Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocystinemia. *Metab Brain Dis.* 2005; 20:97-103.
- Sternfeld M, Shoham S, Klein O, Flores-Flores C, Evron T, Idelson GH, Kitsberg D, Patrick JW, Soreq, H. Excess “read-through” acetylcholinesterase attenuates but the “synaptic” variant intensifies neuro- deterioration correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 8647-8652.
- Strachan MW, Deary IJ, Ewing FM, Frier BM. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care.* 1997; 20:438-445.

- Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R.. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A β deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:7036-7041.
- Tan ZS, Beiser A, Auerbach S, Kiel DP, Wolf PA, Seshadri S. Thyroid function and the risk of Alzheimer's disease: the Framingham study. *Arch Intern Med*. 2008; 168(14): 1514-1520.
- Tel G, Ozturk M, Duru ME, Harmandar M, Topcu G. Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48: 3189-3193.
- Terry AV. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Buccafusco JJ, editor. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009.
- Vajreswari A, Rupalatha M, Rao PS. Effect of altered dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on erythrocyte lipid composition and membrane-bound enzymes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2002; 48: 365-370.
- Valladolid-Acebes I, Stucchi P, Cano V, Fernandez-Alfonso MS, Merino B, Gil-Ortega M, Fole A, Morales L, Ruiz-Gayo M, Olmo ND. High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2010
- Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE, Martin NG, Whitfield JB. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clin Chem*. 2006; 52: 1014-1020.

- Varki A, Kornfeld S. Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J Biol Chem.* 1980; 255: 10847-10858.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* 1982; 215:1237-1239.
- Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, McEwen BS. Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci.* 2005; 119: 1389-1395.