



Posgrado en  
**Biología Experimental**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE NICOTINAMIDA VÍA SISTEMA COLINÉRGICO  
EN UN MODELO DE OBESIDAD EN RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**BIÓL. EXP. ARMANDO RAMÍREZ CRUZ**

**COMITÉ TUTORAL**

**CO-DIRECTORA DRA. MARGARITA DÍAZ FLORES**

**CO-DIRECTOR DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES**

**ASESORA INTERNA DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ**

Noviembre 2019

“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”.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca N° 638428

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, en colaboración con el laboratorio de Biomembranas del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la Co-Dirección de la Dra. Margarita Díaz Flores, el Dr. José Luis Gómez Olivares y la asesoría de la Dra. Beatriz Gómez González.

Agradezco profunda y sinceramente a todos por su paciencia, sus enseñanzas, dedicación y constante apoyo para el desarrollo y la realización de este trabajo.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO


No. 00206

Matrícula: 2173801684

Efecto neuroprotector de nicotinamida via sistema colinérgico en un modelo de obesidad en rata.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 29 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ
- DR. GERARDO BLANCAS FLORES
- DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ
- DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR



*Armando Ramirez Cruz*

ARMANDO RAMIREZ CRUZ  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ARMANDO RAMIREZ CRUZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar


REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

VOCAL



DR. GERARDO BLANCAS FLORES

VOCAL



DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

SECRETARIA



DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR

## **COMITÉ TUTORAL**

### **Co-Directora Externa**

**Dra. Margarita Díaz Flores**

Investigadora Asociada D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica  
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Instituto Mexicano del Seguro Social

### **Co-Director Interno**

**Dr. José Luis Gómez Olivares**

Profesor Titular C

Investigador del Laboratorio de Biomembranas  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

### **Asesora interna**

**Dra. Beatriz Gómez González**

Profesora Titular C

Investigadora en el Área de Neurociencias,  
Departamento de Biología de la Reproducción  
CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

## **FIRMAS DEL COMITÉ TUTORAL**

**Co-Directora Externa  
Dra. Margarita Díaz Flores**

**Co-Director Interno  
Dr. José Luis Gómez Olivares**

**Asesora interna  
Dra. Beatriz Gómez González**

## **ESTE TRABAJO LO DEDICO A MI FAMILIA**

*“Gracias infinitas por apoyarme y siempre confiar en mí, espero esta sea solo una manera en la que pueda retribuirles el que hayan estado siempre a mi lado”.*

A mi madre Tiburcia Cruz Ramírez, por enseñarme a través de su experiencia a perseverar y a superarme. Fuiste la persona que sembró en mí, confianza y ganas de aprender cada día, gracias por hacerme entender que aunque no todo es felicidad he sido afortunado en esta vida.

A mi hermana Verónica Ramírez y a su esposo Luis Arlín Espinoza, por no dejarme solo y apoyarme a lo largo de toda mi formación profesional.

A mi hermana Elizabeth Ramírez por su apoyo, sus consejos, pero sobre todo por sus palabras de ánimo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias a muchas personas, siempre estaré agradecido de que formaran parte de este logro.

Gracias a la Dra. Margarita Díaz por el apoyo desde el día que llegue a su laboratorio, por la confianza y estar siempre pendiente de lo que necesitaba, pero sobre todo por su calidad como investigadora y como persona. Gracias por su entusiasmo y sus consejos.

Al Dr. José Luis Gómez por la comprensión y la disposición, gracias por estos 4 años de apoyo dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a la Dra. Beatriz Gómez, por tener siempre tiempo para las asesorías y ayudarme a resolver mis dudas, gracias por sus excelentes recomendaciones, siempre estaré muy agradecido por sus palabras de ánimo.

Gracias a mis compañeros del peine 2, de la Unidad de Investigación Médica en bioquímica, por la excelente convivencia. A Gaby y a Fernando, por hacer amenos y divertidos los días de trabajo y sobre todo por ser excelentes amigos, sin su apoyo esto no hubiera sido posible. A David y a Carmen gracias por apoyarme desde mi llegada al laboratorio, por la disposición a resolver mis dudas y a enseñarme las técnicas en el laboratorio. A la Mtra. Martha por su amistad y por las palabras de ánimo. A la Dra. Selene por ser un gran apoyo en la realización de este proyecto y sobre todo por su amistad.

Gracias a mis amigos de la maestría: Paola, Samael y a Fabiola, por su amistad y por los buenos momentos de convivencia.

Al Dr. Noé Salinas por la disposición que siempre ha tenido para conmigo, por su gran amistad y apoyo desde la licenciatura.



## RESUMEN

La ingesta excesiva de grasas saturadas y azúcares simples se asocia con el deterioro en el aprendizaje y la memoria. Este tipo de dieta puede producir diferentes cambios fisiológicos, como inflamación sistémica de bajo grado y estrés oxidante. La elevada producción de citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno puede ingresar al sistema nervioso central y afectar la homeostasis neural. En este contexto, la acetilcolina, el principal neurotransmisor parasimpático y regulador de la inflamación podría verse afectado. Las concentraciones de la acetilcolina en órganos y tejidos dependen de su hidrólisis a través de las actividades de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (AChE y BChE, respectivamente). Las modificaciones por la dieta en las colinesterasas aumentan su actividad hidrolizando a la ACh, contribuyendo al proceso de la inflamación y afectando la sinapsis, lo que favorece el deterioro cognitivo. El uso de las vitaminas como adyuvantes para tratar enfermedades inflamatorias es frecuente hoy en día. La nicotinamida (NAM) es una vitamina que ejerce efectos antioxidantes y anti-inflamatorios. En este estudio se evaluó la actividad colinérgica asociada con el efecto antioxidante y anti-inflamatorio de la NAM en un modelo de déficit cognitivo inducido por por dieta. Se distribuyeron 30 ratas macho Sprague Dawley en 5 grupos y se sometieron a los siguientes tratamientos: 1) CON (control); 2) Dieta hipercalórica (HC, 18% de grasa y 40% de sacarosa); 3) HC-NAM 5 mM; 4) HC-NAM 10 mM; 5) HC-NAM 15 mM durante 13 semanas con comida y agua ad libitum. Se evaluaron las actividades de AChE y BuChE, concentraciones de GSH, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y citocinas proinflamatorias; así

como la memoria y el aprendizaje espacial. Los resultados mostraron que la dieta hipercalórica aumentó los triacilglicéridos en plasma, interleucina (IL) -6, TBARS y disminuyó los niveles de IL-10, también aumentó los niveles de TBARS en el hígado y el hipocampo, y disminuyó las concentraciones de GSH. Además, un aumento significativo en las actividades AChE y BuChE en suero e hipocampo, mostrando correlación positiva con un deterioro cognitivo. El presente estudio mostró que la administración de NAM disminuye la inflamación sistémica, regula el aumento de la actividad de las colinesterasas tanto en suero como en hipocampo, a través del aumento de las concentraciones de IL-10, de GSH y disminuir TBARS a nivel de suero, hígado e hipocampo previniendo el deterioro cognitivo causado por los efectos de una dieta hipercalórica.

## ABSTRACT

Excessive intake of saturated fats and simple sugars is associated with learning and memory impairment. This type of diet can produce different physiological changes, such as low-grade systemic inflammation and oxidative stress. The high production of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species can enter the central nervous system and affect neural homeostasis. In this context, acetylcholine, the main parasympathetic neurotransmitter and inflammation regulator could be affected. Acetylcholine concentrations in organs and tissues depends on its hydrolysis through the activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (AChE and BChE, respectively). Changes in the diet increase their cholinesterases activity by hydrolyzing ACh, contributing to the inflammation process and affecting the synapse, which favors cognitive impairment. The use of vitamins as adjuvants to treat inflammatory diseases is frequent nowadays. Nicotinamide (NAM) is a vitamin that exerts antioxidant and anti-inflammatory effects. In this study we evaluated cholinergic activity associated with the antioxidant and anti-inflammatory effect of NAM in a model of diet-induced cognitive deficit. Thirty male Sprague Dawley rats were distributed in 5 groups and subjected to the following treatments: 1) CON (Control); 2) Hypercaloric diet (HC, 18% fat and 40% sucrose); 3) HC-NAM 5 mM; 4) HC-NAM 10 mM; 5) HC-NAM 15 mM for 13 weeks with *ad libitum* food and water. AChE and BuChE activities, GSH concentrations, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and pro-inflammatory cytokines were evaluated; as well as memory and spatial learning. The results showed that the hypercaloric diet increased plasma triacylglycerols, interleukin (IL) -6, TBARS and decreased IL-10 levels, it also increased liver and hippocampal TBARS levels, and

decreased GSH concentrations. In addition, a significant increase in AChE and BuChE activities in serum and hippocampus was observed, showing a positive correlation with cognitive impairment. The present study showed that the administration of NAM decreases systemic inflammation, regulates the increase in cholinesterase activity in both serum and hippocampus, through increased concentrations of IL-10, GSH and decreased TBARS levels at serum, liver and hippocampus preventing cognitive deterioration caused by a hypercaloric diet.

## Tabla de contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	-1-
1.1. Dieta hipercalórica y sus comorbilidades.....	-1-
1.2. El consumo de la dieta hipercalórica y el deterioro cognitivo.....	-3-
1.3. Generalidades de las colinesterasas.....	-4-
1.3. Generalidades de la vitamina B3.....	-8-
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	-9-
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	-15-
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	-15-
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	-15-
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	-15-
6.1. Objetivos particulares.....	-16-
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	-16-
7.1. Consideraciones éticas.....	-16-
7.2. Grupos de estudio, tratamiento con nicotinamida y análisis bromatológico.....	-17-
7.3. Prueba de tolerancia a la glucosa.....	-20-
7.4. Prueba de memoria y aprendizaje.....	-20-
7.5. Obtención de muestras biológicas.....	-21-
7.6. Evaluación de marcadores metabólicos en suero.....	-22-
7.7. Cuantificación de ácidos grasos en suero.....	-22-
7.8. Cuantificación de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10 en suero.....	-22-
7.9. Determinación de GSH en suero, hígado e hipocampo.....	-23-
7.10. Determinación de TBARS en suero, hígado e hipocampo.....	-23-

7.11. Actividad específica de colinesterasas en suero e hipocampo.....	-24-
7.12. Análisis estadístico.....	-24-
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>-26-</b>
8.1 Consumo de alimento, agua y ganancia de peso. ....	-26-
8.2 Curva de tolerancia a la glucosa.....	-28-
8.3 Perfil bioquímico.....	-29-
8.4. Efecto de la nicotinamida sobre la concentración de ácidos grasos en suero. ....	-31-
8.5. Efecto de la nicotinamida sobre marcadores de inflamación.....	-32-
8.6. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de GSH y TBARS en suero.....	-35-
8.7. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de GSH y TBARS hepáticas en rata.....	-37-
8.8. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de GSH y TBARS en el hipocampo.....	-39-
8.9. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad específica de las colinesterasas séricas.....	-41-
8.10. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad específica de las colinesterasas en hipocampo.....	-43-
8.11. Evaluación del aprendizaje en ratas.....	-45-
8.12. Efecto de la nicotinamida sobre la prueba de retención de memoria.....	-46-
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>-47-</b>
<b>10. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>-54-</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>-56-</b>

## **Abreviaturas**

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

GSH: Glutati3n reducido

NAM: Nicotinamida

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

BuChE: Butirilcolinesterasa

ChEs: Colinesterasas

HDL-c: Colesterol-Lipoproteínas de alta densidad

LDL-c: Colesterol-Lipoproteínas de baja densidad

VLDL-c: Colesterol-Lipoproteínas de muy baja densidad

TAG: Triacilgliceroles

AGL: Ácidos Grasos Libres

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina di nucle3tido

NADH: Nicotinamida adenina di nucle3tido reducido

NADP<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina di nucle3tido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina di nucle3tido fosfato reducido

ATP: Adenosín tri-fosfato

ERO: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema nervioso central

HC: Hipercal3rica

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrici3n

OMS: Organización Mundial de la Salud

RER: Retículo endoplásmico rugoso

TLRs: Receptores tipo Toll

LPS: Lipopolisacáridos

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

BHE: Barrera hematoencefálica



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Dieta hipercalórica y sus comorbilidades

En las últimas décadas se ha observado un cambio drástico en el estilo de vida, principalmente en el consumo de alimentos con altas concentraciones de grasas y carbohidratos, así como mayor prevalencia de inactividad física, las cuales en su conjunto contribuyen a un deterioro crónico en la salud, reflejado en el aumento en los índices de obesidad. La obesidad, es un problema de salud que ha alcanzado proporciones epidémicas tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Guillemot & Muccioli, 2017; Tófolo et al., 2019), además de estar relacionada con el aumento de las tasas mundiales de enfermedades crónico degenerativas, como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y algunos tipos de cáncer (Zheng et al., 2016), donde el factor genético y la actividad física también son considerados como elementos causales (Ramli et al., 2016).

Una fuente energética importante para los humanos son los carbohidratos, que son obtenidos a partir de los alimentos que contienen elevados contenidos de carbohidratos, que pueden estar en forma de monosacáridos (glucosa y fructosa) disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa) y polisacáridos (almidón). Los monosacáridos están presentes en la mayoría de alimentos industrializados; este tipo de carbohidratos son absorbidos en el intestino y transportados vía sanguínea a todos los tejidos. En el hígado son introducidos por los hepatocitos a través de sus respectivos transportadores (GLUT 2, 5, 8 y 9), dentro de la célula hepática pueden ser metabolizados para obtener energía en forma de ATP (tri-fosfato de adenosina) o como reservorio en forma de glucógeno.

Cuando existe un consumo excesivo de carbohidratos y las necesidades celulares están cubiertas, los carbohidratos son utilizados para la síntesis de ácidos grasos de *novo*, estos son almacenados principalmente en hígado o tejido adiposo, iniciando un cuadro de inflamación de bajo grado y estrés oxidante que posteriormente puede afectar a órganos y tejidos (Neuschwander-Tetri, 2013). Por otra parte, el consumo de alimentos con altas concentraciones de grasas, principalmente de grasas saturadas, es un factor importante para desencadenar, al igual que los carbohidratos, un incremento en la expansión del tejido adiposo (García & López, 2007). Los lípidos de la dieta se absorben principalmente en el intestino. Aquí sus productos de digestión se unen a las sales biliares para poder ser solubilizados formando micelas mixtas. Posteriormente son transportados a los enterocitos para la resíntesis de ésteres de colesterol, triacilglicéridos y fosfolípidos, los cuales se unen a apolipoproteínas (apo B, C y A) para la formación de los quilomicrones que salen de los enterocitos por exocitosis y pasan a los capilares linfáticos (Yu et al., 2019). En el caso de los ácidos grasos de cadena corta y media pasan directamente al capilar sanguíneo debido a que no requieren ser solubilizados (García & López, 2007). Los triacilglicéridos unidos a quilomicrones, son liberados en forma de ácidos grasos, por acción de la lipoproteína lipasa y llegan al tejido adiposo donde son almacenados como reservorio energético. El almacenamiento de ácidos grasos de manera crónica genera hipertrofia en tejido adiposo, provocando un proceso de inflamación crónica de bajo grado, especies reactivas de oxígeno (ERO) y liberación de ácidos grasos a circulación; todas estas moléculas con potencial para afectar otros órganos periféricos o a nivel de sistema

nervioso central provocando un ambiente inflamatorio y de estrés oxidante llevando a la disfunción del tejido u órgano (SNC) (Yu et al., 2019).

## **1.2. El consumo de la dieta hipercalórica y el deterioro cognitivo**

El consumo frecuente de dietas altas en calorías se ha asociado con el padecimiento de diversos trastornos psiquiátricos, entre los que se incluyen: alimentarse compulsivamente, bulimia, depresión y las disfunciones cognitivas (Bednarska et al., 2017). Las afectaciones en las funciones cognitivas incluyen problemas en la memoria y el aprendizaje afectando la capacidad mental en personas con sobrepeso u obesidad (Manchanda & Kaur, 2017).

En Investigaciones previas se han encontrado una asociación entre la obesidad, la inflamación periférica de bajo grado y el deterioro cognitivo en las diversas etapas de desarrollo del humano, desde la infancia, la adolescencia y la edad adulta, donde los niños y adolescentes han mostrado un deterioro en las capacidades cognitivas (Manchanda & Kaur, 2017).

El consumo de una dieta hipercalórica (HC), que incluye alimentos chatarra que resultan atractivos para niños y adolescentes, contribuye a aumentar la susceptibilidad de órganos como el hígado, páncreas, riñones, corazón, cerebro, entre otros a presentar cambios en su función comprometiendo la salud física y mental (Zheng et al., 2016). Este tipo de dietas HC se asocian con modificaciones neurobiológicas en adolescentes que no se observan en adultos con una dieta equivalente; esto se debe a que en la etapa de la adolescencia algunas regiones del cerebro no se han

desarrollado completamente y, por lo tanto, son más vulnerables a las alteraciones de una dieta hipercalórica (Reichelt et al., 2019).

El cerebro es susceptible a la desregulación y liberación de adipocinas como las citocinas pro-inflamatorias y a las especies reactivas de oxígeno (ERO) que provocan alteraciones en la neuroplasticidad, reflejándose como deficiencia en el procesamiento cognitivo y emocional (Boitard et al., 2016). Esto es alarmante debido a que la adolescencia es un periodo de conformación neuroconductual requerido para el procesamiento cognitivo a lo largo de la vida (Boitard et al., 2016).

En México los adolescentes con riesgo de padecer déficit cognitivo son muchos, ya que en esta etapa la prevalencia de obesidad y sobrepeso en 2016 incrementó con respecto al 2012 pasando de un 34.9% a 36.3% respectivamente (ENSANUT, 2016). En relación a lo anterior, en el año 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que 2,240 millones de personas padecen sobrepeso u obesidad incluyendo niños, jóvenes y adultos, lo que se traduce en que aproximadamente una tercera parte de la población mundial presenta esta enfermedad y con un alto riesgo de padecer deterioro cognitivo a través de afectar el sistema colinérgico, alterando la actividad de las colinesterasas y las concentraciones del neurotransmisor acetilcolina en hipocampo modificando la sinapsis y con ello provocando pérdida en la memoria y aprendizaje.

### **1.3. Generalidades de las colinesterasas**

Las colinesterasas (ChEs) pertenecen a una familia de enzimas que son hidrolasas especializadas en descomponer los ésteres de colina; la familia incluye a la

acetilcolinesterasa (AChE; E.C.3.1.1.7) y a la butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8). La acetilcolinesterasa también llamada “colinesterasa verdadera” hidroliza al neurotransmisor acetilcolina (ACh), un evento que finaliza la transmisión sináptica y se encuentra principalmente en uniones neuromusculares y en las sinapsis colinérgicas del SNC. La butirilcolinesterasa también conocida como “pseudocolinesterasa” o “colinesterasa sérica”, hidroliza succinilcolina, pero también puede usar como sustrato a la acetilcolina, es sintetizada principalmente en el hígado, pero se puede detectar su actividad en otros órganos periféricos, suero y en SNC (Lionetto et al., 2013).

La AChE es una enzima de gran importancia en la sinapsis colinérgica donde para llevar a cabo su función requiere modificaciones post-traduccionales, siendo la glicosilación la más sobresaliente (Rotundo, 2017). En vertebrados, el gen ACHE por un proceso de corte y empalme alternativo se pueden generar tres variantes de transcritos quienes comparten un 95% de similitud en la secuencia nucleotídica. Sin embargo, difieren en su extremo carboxilo-terminal (Sánchez & Salceda, 2008). Las variantes incluyen al transcrito AChE-S o AChE-T (“S” indica sináptico o “T” indica “con tallo”) por la isoforma que codifica (Massoulié et al., 1993; Soreq & Seidman 2001; Massoulié, 2002); la AChE-E (“E” indica eritrocítica; también se conoce como AChE-H, “H” indica hidrofóbica) (Coussen et al. 2001); y el transcrito “read-through” AChE (AChE-R), que se genera por el corte-empalme alternativo en la región 3’ (Kaufer et al., 1998; Meshorer et al., 2002).

El transcrito AChE-T(S) codifica a las isoformas hidrofílicas (hidrosolubles) como los monómeros (G1H), dímeros (G2H), tetrámeros (G4H); a formas moleculares anfifílicas como los monómeros (G1A), dímeros (G2A) y tetrámeros (G4A) anclados a la

membrana por un péptido hidrofóbico rico en prolina (PRIMA) (Rakonczay, 2003; Lane et al., 2005); y a formas denominadas asimétricas, como los tetrámeros unidos a triple hélice tipo colágeno, ejemplo A4 (1 tetrámero), A8 (2 tetrámeros) y A12 (3 tetrámeros) (Massoulié et al., 1993). Mientras, que el transcrito AChE-E (H) codifica a monómeros y dímeros que pueden anclarse a la membrana plasmática a través de un enlace glicofosfatidilinositol (GPI). Finalmente, la variante soluble AChE-R codifica a una forma molecular monomérica hidrosoluble, que es inducida en situaciones de estrés (Lionetto et al., 2013; Rotundo, 2017).

La BuChE es codificada por el gen BCHE, que genera un solo transcrito BchE-T, para la síntesis de formas moleculares hidrofílicas: monómeros (G1H), dímeros (G2H) y tetrámeros (G4H) y formas moleculares anfifílicas: monómeros (G1A), dímeros (G2A), tetrámeros (G4A) (Rakonczay, 2003; Lane et al., 2005). El hígado es el principal órgano productor de la enzima butirilcolinesterasa. Este órgano posee la capacidad de sintetizar dos tipos de reservorios de la enzima, uno de la actividad propia del órgano y la segunda, que se depositará en el plasma (Gómez et al., 2000). También, se ha detectado en el estómago, el riñón, pulmón, músculo, cerebro, entre otros tejidos (López et al., 2018). Es una enzima que hidroliza ester de colina y no colina, principalmente succinilcolina y propionilcolina. Su deficiencia se puede generar de forma hereditaria, viéndose más afectados aquellos con ascendencia europea y asiática, o adquirida, incluyendo a personas de edad avanzada, envenenamiento, por organofosforados, desnutrición, entre otras condiciones (Chen et al., 2017). La deficiencia en esta enzima genera una mayor sensibilidad a medicamentos relajantes musculares; ester de colina como la succinilcolina, así como a plaguicidas, cocaína

y anestésicos. Debido a que se le ha atribuido la capacidad de secuestrar compuestos tóxicos, BuChE puede proteger de una gran variedad de sustancias administradas e inhaladas (Macdonald et al., 2017; López et al., 2018).

Ambas colinesterasas son glicoproteínas, la AChE posee tres sitios potenciales de N-glicosilación, y la BChE presenta ocho sitios. En el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) se les incorpora un oligosacárido rico en manosa en el residuo de aminoácido de asparagina. Se remodela el oligosacárido por la acción de glucosidasas y manosidasas. La proteína sale del RER hacia el Complejo de Golgi por transporte vesicular, en las diferentes cisternas de éste organelo se incorporan y añaden otros carbohidratos, siendo indispensables para que adquiera una estructura tridimensional adecuada para que cumpla su función, además de definir la vida circulatoria de ambas proteínas (Cabezas et al., 2002). La porción glicosídica que se incorpora a la porción proteínica de las colinesterasas, llega a representar un 10% del peso molecular en el caso de la AChE y hasta un 20% de la BuChE (Cabezas et al., 2002).

Las alteraciones en la actividad de las ChEs en sistema nervioso central se ha atribuido a un incremento al estrés oxidante y a la inflamación por el consumo de alimentos con alto contenido calórico, por lo que en este sentido se ha propuesto que las vitaminas por su efecto antioxidante y anti-inflamatorio podrían prevenir estas alteraciones y por ende el deterioro cognitivo. Para el tratamiento del síndrome metabólico y el deterioro cognitivo se han desarrollado diversas estrategias farmacológicas y no farmacológicas. Una alternativa al respecto, la representa la vitamina B3.

#### **1.4. Generalidades de la vitamina B3**

La vitamina B3 es una vitamina hidrosoluble conocida como niacina, nombre genérico para dos compuestos específicos, ácido nicotínico y nicotinamida, los cuales son indispensables para la formación de las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>), importantes para reacciones de oxidación-reducción implicadas en la producción de energía o como sustratos de enzimas que participan en vías de señalización no redox, las cuales regulan funciones biológicas como daño al DNA, progresión del ciclo celular, la expresión de genes, el catabolismo de las grasas, proteínas y carbohidratos (Thompson et al., 2008; Gasperi et al., 2019).

La vitamina B3 puede ser sintetizada por el organismo a partir de triptófano en una conversión 60:1 (triptófano: B3), por lo que los mamíferos/el organismo depende/n principalmente de la dieta para poder obtener la vitamina necesaria para su funcionamiento. Algunos alimentos fuente de esta vitamina son el pescado, la carne, aves de corral y los cereales; sin embargo, su absorción es variable. El consumo de la vitamina a partir de los alimentos no presenta efectos adversos, pero si se pueden presentar síntomas de intoxicación si es ingerida en forma de suplemento y sin supervisión médica. Entre los síntomas presentados está salpullido con ardor, hormigueo y picor, manchas en la cara, brazos y pecho, además de daño hepático. La deficiencia severa de la vitamina B3 da como resultado la aparición de la pelagra con síntomas iniciales que pueden llevar a un cuadro de dermatitis, diarrea y demencia (Thompson et al., 2008; Kirkland et al., 2013). Nicotinamida como precursora de coenzimas es de gran importancia en el metabolismo de lípidos, de carbohidratos y en



la protección contra el estrés oxidante y la inflamación, factores característicos en individuos obesos, por lo que su disponibilidad es muy importante para la regulación del metabolismo celular.

## **2. ANTECEDENTES**

El consumo excesivo de una dieta hipercalórica con alto contenido en grasas saturadas y carbohidratos conduce a un metabolismo energético positivo que ocasiona expansión del tejido adiposo, generando hipertrofia y una desregulación en la secreción de adipocinas las cuales son altamente bio-activas. La expansión del tejido adiposo desencadena la infiltración de macrófagos que exacerbaban la inflamación a través de la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias, ERO y ácidos grasos hacia la circulación, que en conjunto con células inmunes (macrófagos, linfocitos y neutrófilos) y la disbiosis intestinal generan un ambiente inflamatorio sistémico de bajo grado (Wernstedt et al., 2014; Park et al., 2016).

Las adipocinas ejercen un efecto pleiotrópico regulando importantes funciones fisiológicas como el apetito, gasto energético, metabolismo de lípidos y glucosa, funciones neuroendócrinas y de inmunidad (Bednarska et al., 2017), así como un efecto de lipotoxicidad en tejidos periféricos (Yamaguchi & Yoshino, 2017). La lipotoxicidad producto de la lipólisis del tejido adiposo y de los componentes de la dieta está asociada con la inflamación sistémica de bajo grado y el estrés oxidante, los cuales se relacionan directamente con deterioro cognitivo (Bednarska et al., 2017). Hasta hace algunos años se creía que el fenotipo obeso era el causante de la lipotoxicidad; sin embargo, diversas investigaciones realizadas en modelos

experimentales de roedores a los que se les administró una dieta hipercalórica encontraron que se generaba un cuadro de inflamación sistémica y neuroinflamación a corto plazo (días) en ausencia de obesidad (Thaler et al., 2012; Waise et al., 2015), lo que indica una desregulación en el tejido adiposo ante la ingesta excesiva de alimentos hipercalóricos.

A pesar de que el SNC cuenta con la barrera hematoencefálica (BHE), una estructura que protege y regula el transporte de moléculas de origen sistémico, dicha estructura está expuesta a experimentar cambios que pueden afectar el intercambio de moléculas que comprometen la integridad y/o función del cerebro (Guillemot & Muccioli, 2017). En este contexto, las citocinas mediadoras de la inflamación sistémica y las ERO bajo ciertas circunstancias, como la ingesta de dietas HC, obesidad o diabetes, pueden afectar la integridad de la barrera BHE, facilitando su ingreso al cerebro y activando a los astrocitos, a la microglía y con ello disminuyen la plasticidad sináptica y la neurogénesis del hipocampo (Boitard et al., 2016; Shalev & Arbuckle, 2017; Guillemot & Muccioli, 2017). Asimismo, las citocinas y las ERO pueden provocar daño en la función neuronal iniciando un proceso apoptótico en regiones como el hipocampo y la corteza que son de importancia para la memoria y aprendizaje (Shalev & Arbuckle, 2017).

Con esta apreciación, alteraciones o excesos en los componentes de la dieta pueden desencadenar varios desordenes metabólicos en la vida del individuo, aumentando la vulnerabilidad del cerebro a enfermedades neurológicas (Neha et al., 2014).

Se ha descrito que los ácidos grasos saturados liberados a partir del tejido adiposo o del metabolismo de la dieta estimulan la señalización de los receptores tipo Toll (TLRs,

por sus siglas en inglés), promoviendo en los macrófagos la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL)-6 e IL-1 $\beta$ , que son liberados a la periferia afectando a otros tejidos y órganos (Nagai et al., 2013), entre ellos, el cerebro. En el cerebro los ácidos grasos libres (AGL), las citocinas pro-inflamatorias y las ERO afectan la integridad de la BHE. La alteración en la integridad de la BHE permite el paso de citocinas, ERO, lipopolisacáridos (LPS) y AGL, estos últimos pueden unirse a los TLRs de la microglía y astrocitos estimulando un ambiente inflamatorio y oxidante, causando una disminución en la población neural a través de una respuesta apoptótica (Maldonado et al., 2017).

En el cerebro el estrés oxidante incrementa la lipoperoxidación, oxidación de proteínas y daño al DNA en las neuronas y células gliales, por ello se ha sugerido que los radicales libres están relacionados con la muerte neuronal (Rojas et al., 2017).

El hipocampo es una de las estructuras del cerebro más importantes en el aprendizaje y la memoria (Guillemot & Muccioli, 2017), por lo que su deterioro inducido por la neuroinflamación puede ocasionar disminución en la población neuronal y desencadenar un deterioro cognitivo (Mellendijk et al., 2015). El daño o afectación en el hipocampo inducido por la neuroinflamación se puede ver reflejado en un cambio en los niveles de actividad enzimática, tal es el caso de las ChEs, quienes cumplen una función relevante en las sinapsis de esas regiones asociadas con el aprendizaje y la memoria (Sodhi & Singh, 2013).

Duchnowicz et al (2018) en un estudio en jóvenes que habían desarrollado síndrome metabólico observaron que la actividad de AChE y BuChE en suero estaban incrementadas junto con un aumento en el nivel de lipoperoxidación. Por otra parte, en

el cerebro un aumento en la actividad de AChE es muy relevante. En este aspecto, en personas con Alzheimer se ha reportado un aumento en la actividad de las colinesterasas, lo que causa una deficiencia en la concentración del neurotransmisor ACh, viéndose afectada la sinapsis y conduciendo a un deterioro cognitivo (Sodhi & Singh, 2013).

En la actualidad no es claro si la actividad de BuChE es importante en la progresión de la enfermedad de Alzheimer; no obstante, en pacientes que padecen esta enfermedad se ha determinado un aumento en la actividad de BuChE (Macdonald et al., 2017). Asimismo, se ha establecido un papel sinérgico de la actividad de BuChE con los niveles de la ApoE4 en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (Gabriel et al., 2018).

Se ha establecido que la acetilcolina posee propiedad anti-inflamatoria (Rao et al., 2007), por lo que sus concentraciones son de gran importancia para llevar a cabo tal efecto. Siendo evidencia la ACh de un mecanismo endógeno que está relacionado con la vía colinérgica anti-inflamatoria al regular la secreción de citocinas. Cuando hay ACh disponible en las regiones en las que abundan los macrófagos activados, al interactuar con sus receptores nicotínicos provoca una reducción en la síntesis y/o liberación de citocinas pro-inflamatorias estimulada por LPS o AGL (Herman et al., 2017). Por ello, las ChEs podrían contribuir al proceso inflamatorio neural e influir en el déficit cognitivo, a través de hidrolizar ACh, bajando sus concentraciones y con ello incrementar la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Existen informes en los que la administración de una dieta alta en grasas causa un incremento en la actividad de AChE y BuChE en cerebro, situación que lleva a una mayor hidrólisis de ACh, por lo que su concentración

disminuye y con ello un incremento en la inflamación cerebral, adjudicando a las ChEs una función pro-inflamatoria y contribuyendo al deterioro cognitivo (Amin et al., 2011; Sodhi & Singh, 2013).

En este contexto, las investigaciones actuales en este campo sugieren el uso de algunas vitaminas, como compuestos bio-activos importantes para la salud (Fricker et al., 2018). Para el organismo es muy importante la obtención de macronutrientes y micronutrientes para un buen funcionamiento, entre ellos están las vitaminas (Spector & Johanson, 2007), como es el caso de la nicotinamida también conocida como vitamina B3 (Fricker et al., 2018).

La nicotinamida (NAM) en su forma amida de la vitamina B<sub>3</sub>, es precursora de los dinucleótidos de adenina y nicotinamida (NAD<sup>+</sup>), NADH, NADP y NADPH. Estas coenzimas participan en la transferencia de electrones mediante una serie de reacciones redox que están involucradas en muchos procesos del metabolismo celular; entre los cuales se encuentra el ciclo del ácido cítrico, la beta oxidación de los ácidos grasos y el catabolismo de los amino ácidos (Spector & Johanson, 2007; Song et al., 2017), también participa en reacciones no reversibles relacionadas con la señalización celular que regulan el daño del DNA y el metabolismo. Por otra parte, actúa como sustrato para la adición enzimática (ADP ribosilación), participa en remover modificaciones postraduccionales (desacetilar) o en la generación de segundos mensajeros (ADP ribosa cíclica) (Strømmland et al., 2019). Es de mencionar que participa en otras reacciones enzimáticas que le proporcionan una función antioxidante, inmunoreguladora, anti-apoptótica, anti-inflamatoria y anti-cancerígena, dando protección a la célula (Thompson et al., 2008; Fricker et al., 2018). Existen

evidencias que indican que protege a las células beta pancreáticas al disminuir los niveles de citocinas pro-inflamatorias y la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés), que puede generar especies reactivas de nitrógeno. Además, estimula la producción de ATP a través de un incremento en los cofactores indispensables para la cadena respiratoria (Thompson et al., 2008). Es importante destacar que los cambios en el equilibrio entre consumo/agotamiento y síntesis/reciclamiento de NAD<sup>+</sup> alteran la bioenergética celular, el metabolismo y la homeostasis redox (Verdin, 2015).

Como precursor de la coenzima NAD<sup>+</sup>, nicotinamida incrementa los niveles de NADPH, ejerciendo una función antioxidante muy importante en el reciclamiento de glutatión (GSH) en su forma reducida a través de la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH aumentando los niveles de GSH y disminuyendo los niveles de ROS en un modelo de ratas suplementadas con dieta hipercalórica (Song et al., 2017; Mejia et al., 2018).

Recientemente se propuso la función del metabolismo de NAD<sup>+</sup> en la neurodegeneración, específicamente en la señalización dependiente de NAD<sup>+</sup> y su función protectora contra la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en la neurodegeneración (Franco & Vargas, 2018). La nicotinamida es la forma de vitamina B3 con más prevalencia en el cerebro, pues aunque se sabe que el ácido nicotínico cruza la BHE, este es convertido rápidamente a nicotinamida (Spector, 1979). La permeabilidad de la nicotinamida a través de la barrera hematoencefálica es por un sistema de difusión facilitada con muy baja afinidad y alta capacidad (Spector & Johanson, 2007).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La obesidad es un problema que ha ido en aumento con el paso del tiempo. En 2016, en México 3 de cada 10 niños, 4 de cada 10 adolescentes y 7 de cada 10 adultos padecían obesidad o sobrepeso, lo que incrementa el riesgo de desarrollar déficit cognitivo. En este contexto nicotinamida debido a sus propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y con una importante acción en el metabolismo celular podría ser una excelente alternativa en prevenir el déficit cognitivo inducido por una dieta hipercalórica, a través de disminuir la inflamación, el estrés oxidante y con ello regular la actividad de las colinesterasas.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La administración de la nicotinamida en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica atenuará el déficit cognitivo y la actividad de las colinesterasas en cerebro?

### **5. HIPÓTESIS**

La nicotinamida mejora la capacidad cognitiva por su acción neuroprotectora, anti-inflamatoria y antioxidante, a través de regular la vía colinérgica alterada por una dieta hipercalórica en rata.

### **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la administración de nicotinamida sobre la actividad cerebral de las colinesterasas y el déficit cognitivo inducidos por la alimentación con dieta hipercalórica en un modelo de rata.

### **6.1. Objetivos particulares**

- Evaluar la memoria y el aprendizaje espacial en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.
- Determinar el re-establecimiento total o parcial del perfil bioquímico sérico por la administración de nicotinamida.
- Establecer el efecto anti-inflamatorio de nicotinamida en suero
- Evaluar el efecto de la nicotinamida sobre la actividad de las colinesterasas cerebrales.
- Correlacionar el déficit cognitivo con la actividad de las colinesterasas en ratas expuestas a una dieta hipercalórica.
- Establecer la acción antioxidante de nicotinamida
- Evaluar el nivel de lipoperoxidación por la administración de la nicotinamida.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1. Consideraciones éticas**

Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, el cuidado y uso de animales de laboratorio se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2015). El protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité Local de Investigación en Salud (CLIS) del Hospital de Especialidades, CMN.

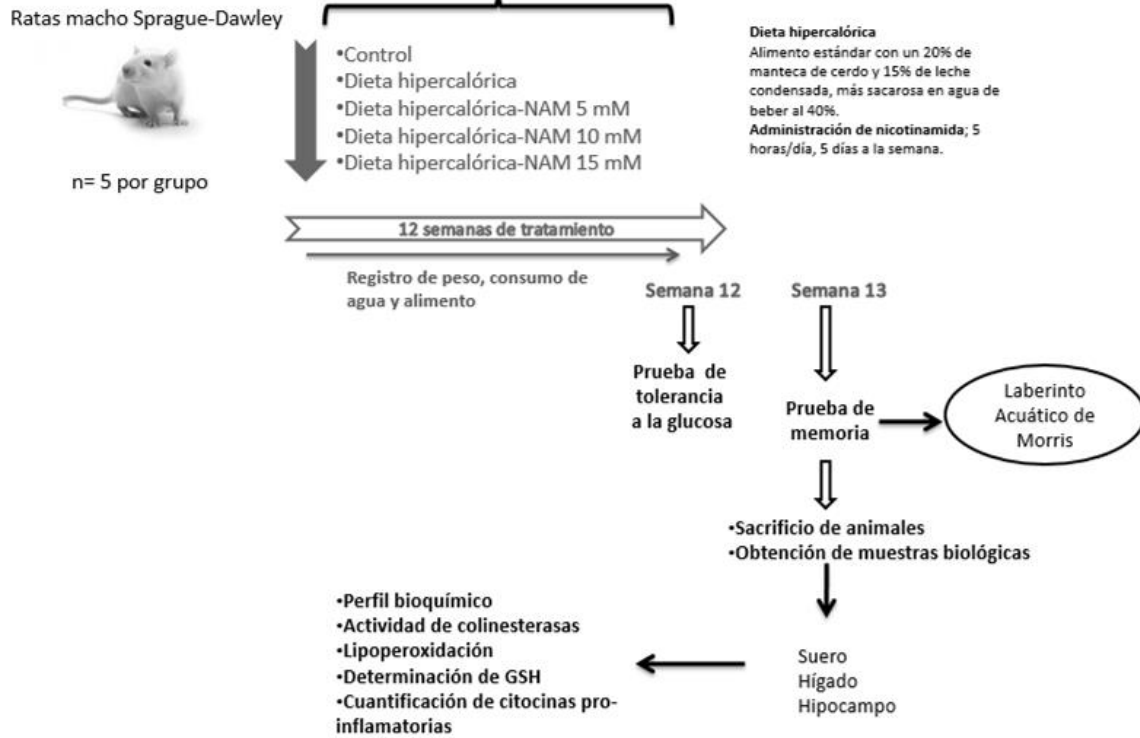


## **7.2. Grupos de estudio, tratamiento con nicotinamida y análisis bromatológico**

Se utilizaron treinta ratas de la cepa Sprague Dawley con un peso de  $250 \pm 5$  g en condiciones controladas de temperatura ( $22.5$  °C), humedad (50%) y periodos luz/oscuridad (12/12hrs); distribuidos en cinco grupos bajo los siguientes tratamientos: 1) Control ( CON, dieta estándar); 2) Dieta hipercalórica (HC); 3) Dieta hipercalórica-Nicotinamida 5 mM (HC-NAM5); 4) Dieta hipercalórica-Nicotinamida 10 mM (HC-NAM10); 5) Dieta hipercalórica-Nicotinamida 15 mM (HC-NAM15). El alimento con alto contenido en grasa se elaboró en el laboratorio, a partir de la dieta estándar (LabDiet® 5008) más 20% de grasa (manteca de cerdo) y 15% de lechera (cantidad de fructuosa? en gramos) por kilogramo de alimento. La administración de la sacarosa al 40% se llevó a cabo en el agua de beber. En el caso de la NAM se administró en el agua de beber durante cinco horas diarias (9 a 14 horas); terminado el tratamiento la NAM fue remplazada por agua o sacarosa según el caso. El agua, la sacarosa y el alimento para todos los grupos fue *ad libitum*.

La duración de los tratamientos fue de 3 meses, tiempo en el que se realizó un registro en el consumo de alimento, agua y ganancia de peso corporal. Al término de los tratamientos (semana 12) se efectuó la prueba de tolerancia a la glucosa, así como la prueba del laberinto acuático de Morris para evaluar el aprendizaje y memoria espacial.

## Diseño experimental



Análisis bromatológico realizado por el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, C.U.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**Informe de prueba:  
Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos**

Fecha de análisis: 

Del 13 al	22 de marzo	2019
-----------	-------------	------

**Resultados:**

La Tabla muestra los resultados que son promedio de 3 repeticiones con un CV menor al 5%

Análisis químico proximal	
Muestra(s)	Comida para ratas
Componente	Resultado (por cada 100 g)
Humedad (g)	1.70
Cenizas (g)	3.59
Grasa (g) (extracto etéreo)	18.38
Proteína* (g)	11.76
Fibra dietética (g)	19.52
Carbohidratos digeribles totales** (g)	45.05
Valor energético (kcal)	392.66

Los resultados reportados son representativos sólo de la muestra recibida.  
El muestreo y representatividad de la muestra recibida en este laboratorio es responsabilidad de la empresa y/o del solicitante

**Observaciones:**

- \*Para cuantificar proteína se empleó el factor 6.25
- \*\*Los carbohidratos digeribles totales se cuantifican por diferencia (100 - (%Humedad + %cenizas + %grasa + %proteína + fibra dietética))

Referencia: US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 (Slightly revised). Version Current: May 2016. Internet: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/nd>



### **7.3. Prueba de tolerancia a la glucosa**

Una vez finalizados los tratamientos, se realizó la determinación de glucosa basal con un ayuno de 8 horas. La muestra de sangre fue obtenida por corte sagital en el extremo de la cola de la rata y la concentración de glucosa se midió con el glucómetro Freestyle Optium (Abbott Laboratories, Madrid, España). Posteriormente se administró a cada animal una solución de glucosa al 50% (2g/Kg de peso, i.p.) y se registraron las concentraciones de glucosa a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos.

### **7.4. Prueba de memoria y aprendizaje**

La prueba del Laberinto Acuático de Morris (Morris, 1984) fue utilizada para evaluar aprendizaje y memoria espacial en los animales; la cual se realizó posterior a la prueba de tolerancia a la glucosa. Para efectuar la prueba fue necesario condiciones estándar a la prueba de Morris contar con una piscina de 150 centímetros de diámetro por 50 centímetros de profundidad, dividida en cuadrantes virtuales y colocando marcas visuales (figuras de papel, diferentes en forma y color), en la parte central de uno de los cuadrantes se instaló una plataforma cuadrada de acrílico transparente con dimensiones de 25x12x12 cm. Antes de aplicar la prueba, la alberca se llenó 3/5 partes con agua teñida (violeta de genciana), quedando la plataforma 2 centímetros por debajo del nivel del agua (oculta). El agua se ajustó a una temperatura de  $26\pm 2$  °C. La sesión de entrenamiento inició colocando a la rata suavemente en el agua frente al borde de uno de los cuadrantes y se midió el tiempo en que la rata tardó en encontrar la plataforma (máximo 1 minuto); si la encontró antes de los 60 segundos se le dejó 15 segundos sobre la misma, de lo contrario se le dirigió hasta ella dejándola 15

segundos, posteriormente se regresó a la rata a su caja. Cada animal se sometió a 4 ensayos por día (uno por cuadrante) durante 5 días consecutivos teniendo una duración aproximadamente de 8 minutos por rata. Se dejaron 2 días de descanso y en el día 6 de la prueba se retiró la plataforma y se realizó el mismo ensayo una sola vez, colocando a la rata en el cuadrante opuesto a donde se encontraba la plataforma y dejándola nadar por 60 segundos. Pasado el tiempo se retiró a la rata de la alberca. Todos los ensayos fueron video grabados y analizados.

Los parámetros que se analizaron para la fase de aprendizaje (adquisición de memoria) y para la fase de retención memoria fueron: Latencia de escape (primeros 5 días de la prueba) donde se midió el tiempo que la rata tardó en encontrar la plataforma (a mayor tiempo es menor el aprendizaje) y retención (día 6) donde se valoró el tiempo de permanencia en el cuadrante donde se encontraba la plataforma (a mayor tiempo, mejor aprendizaje y memoria).

### **7.5. Obtención de muestras biológicas**

Finalizados los tratamientos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg vía i.p.) para obtener sangre total de la vena cava, la cual fue centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C para obtener el suero y formar alícuotas de 100 uL para las determinaciones correspondientes. A continuación, se procedió a la disección del hipocampo el cual fue almacenado (a -70°C) para sus respectivas determinaciones.

### **7.6. Evaluación de marcadores metabólicos en suero**

El perfil bioquímico incluyó: glucosa, triacilglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol-lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) y colesterol-lipoproteínas de baja densidad (LDL-c). Además, pruebas de daño hepático: alanina amino transferasa (ALT por sus siglas en inglés), alanina aspartato transferasa (AST por sus siglas en inglés) y gama glutamil transpeptidasa (GGT por sus siglas en inglés) utilizando el equipo automatizado SPOTCHEM EZ SP-4430 teniendo en cuenta todas las instrucciones del proveedor.

### **7.7. Cuantificación de ácidos grasos en suero**

La determinación de los ácidos grasos en suero se realizó mediante el Kit “Free Fatty Acid Quantification” (Biobision, Milpitas USA) siguiendo cada una de las recomendaciones por parte del fabricante.

### **7.8. Cuantificación de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10 en suero**

La cuantificación de TNF- un marcador pro-inflamatorio, se utilizó el kit comercial EZRTNFA rat (rat TNF- $\alpha$  elisa kit cat 900-k86), siguiendo las indicaciones del proveedor. El análisis de interleucina 6 (IL-6), un marcador pro-inflamatorio se utilizó un kit comercial siguiendo las indicaciones del proveedor la concentración de la curva estándar fue de 5-100 pg/mL, la especificidad de 2 pg/mL (Peprotech, Rat IL-6 Standard ABTS ELISA Development Kit, USA). La cuantificación de interleucina 10 (IL-10) un marcador anti-inflamatorio se realizó mediante un kit comercial TOMBO, mause (ABCAM, IL-10 ELISA Matched Antibody Pair Kit, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor, las absorbancias se midieron a 450 nm utilizando un lector

de microplacas Labsystems Multiskan EX de 96 pozos (Helsinki, Finlandia). El coeficiente de variación intra-ensayo fue <7%.

### **7.9. Determinación de GSH en suero, hígado e hipocampo**

Fragmentos de hipocampo o hígado fueron homogeneizados (10% p/v) en ácido Meta fosfórico al 5% ó PBS 0.1 M pH 7.5 para determinar GSH. Los homogeneizados fueron centrifugados a 14 000 rpm por 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST 40R; con los sobrenadantes se realizaron las determinaciones. GSH se determinó espectrofotométricamente empleando el reactivo de Ellman (5-5'-ditiobis (2-nitro ácido benzoico), DTNB). El ensayo se basa en la reacción estequiométrica entre el DTNB y el grupo tiol del GSH. El nitro-mercapto benzoato formado presenta una absorbancia máxima a 412 nm proporcional a la concentración de GSH. Para la determinación de GSH en suero se tomaron 100 uL de la muestra y se realizó la metodología antes mencionada.

### **7.10. Determinación de TBARS en suero, hígado e hipocampo**

Alícuotas de homogeneizados de hipocampo e hígado (PBS 0.1 M pH 7.5) y suero fueron utilizadas para determinar el grado de lipoperoxidación evaluado como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés) mediante una técnica espectrofotométrica. El fundamento del método se basa en la reacción producida entre el ácido tiobarbitúrico (TBA por sus siglas en ingles) y el producto de lipoperoxidación, malondialdehído (MDA), que origina TBARS que puede medirse mediante espectrofotometría a 595 nm (Asakawa & Matsushita, 1979).

Brevemente, el homogenizado al 10% o la muestra de suero se incubó con ácido tiobarbitúrico 110 mM y ácido fosfórico 200 mM durante 1 hora a 90°C. El MDA fue extraído con 400 µL de n-butanol. La absorbancia de la fase orgánica fue medida en el lector de placas Multiskan EX, Labsystems (Helsinki, Finland). El estándar de MDA se preparó con 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano.

### **7.11. Actividad específica de colinesterasas en suero e hipocampo**

Para la determinación celular de las colinesterasas en hipocampo se prepararon homogeneizados en amortiguador a base de Trizma hydrochloride 15 mM, Cloruro de sodio (NaCl) 1 M, Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 50 mM, ácido etilen diaminotetraacético (EDTA) 3 mM, Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético (EGTA) 1 mM y Brij 97 (Polyoxyethylene (10) oleyl ether) Posteriormente fueron centrifugados a 15000 rpm por 15 min en una centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST 40R, en el sobrenadante se realizaron las determinaciones.

El método empleado fue el de Ellman y colaboradores (1961). El fundamento del método consiste en utilizar los tio-análogos (acetiltiocolina y butiriltiocolina) e inhibidores ( iso-OMPA Y BW284C51) específicos de cada enzima, que al fragmentar al tio-análogo se obtiene acetato/butirato y tio-colina, éste último al reaccionar con el ácido di-tio-benzoico (DTNB) forma un cromóforo cuya producción es proporcional a la actividad de cada enzima y que se detectará espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas de microtitulación (BioTex, USA). Las actividades fueron expresadas como actividad específica, para ello se determinaron las proteínas totales en suero por el método de Bradford (1976),



(Bradford Reagent, Sigma- Aldrich) que consiste en la unión de los aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul de Coomassie el cual absorbe a 595 nm. Para la determinación de proteínas en hipocampo se utilizó el método de Lowry (1951) que se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio-alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molibdicico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría a una absorbancia de 660 nm. Las lecturas se realizaron con un lector de placas de microtitulación (BioTex, USA). Se elaboró una curva de calibración usando como proteína estándar la albúmina sérica bovina en el intervalo 1 a 10 mg/mL.

#### **7.12. Análisis estadístico**

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estandar de cinco experimentos independientes realizados por duplicado por grupo de experimentación. La comparación multi-grupos se realizó con la prueba de ANOVA y el análisis *post-hoc* entre los grupos mediante la prueba de Tukey-Kramer. Todos los cálculos estadísticos realizados se analizaron mediante el software GraphPad Prism 5 software. Una  $p < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Consumo de alimento, agua y ganancia de peso

La Tabla 1 muestra el registro de peso corporal, consumo de alimento, de bebida edulcorada y total de calorías consumidas al final de los tratamientos. No obstante del consumo de calorías por semana (925 calorías) debido a la dieta hipercalórica en los grupos bajo este régimen, la ganancia de peso no fue significativa en ninguno de los grupos con respecto al grupo CON.

La ganancia de peso del grupo HC al final del tratamiento fue de 6.8% con respecto al grupo CON, sin diferencias estadísticas. En aquellos grupos a los cuales se les la dieta HC y la administración de NAM a diferentes concentraciones (5, 10 y 15 mM) no mostraron diferencia significativa en comparación con el grupo HC ni con el grupo CON.

Respecto al consumo de alimentos, se observó que el grupo HC consumió 48% menos alimento comparado con el grupo CON. La misma tendencia se observó en los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 mM comparados con el grupo CON. En contraste los grupos HC-NAM 5 y 15 mM tuvieron un aumento significativo en el consumo de alimento (25 y 40% respectivamente) comparados con el grupo HC., indicativo de recuperación del efecto inhibitorio sobre la señal de hambre-saciedad.

Por lo que respecta al consumo de sacarosa no se observó diferencias significativas entre los grupos de animales HC-NAM 5 y 15 mM en comparación con al grupo HC, mientras el grupo NAM 10 mM mostró un 16% menos del carbohidrato consumido con significancia. Al parecer una cantidad mayor de calorías consumidas repercute en menor consumo de alimento.

La mayor cantidad de calorías consumidas significativamente correspondió al grupo HC con un 60% más con respecto al grupo CON. Los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 mM no mostraron diferencias significativas en el consumo de calorías cuando se comparó con el grupo HC, pero sí mostraron un aumento con diferencia significativa cuando son comparados con el grupo CON (70, 55 y 76%, respectivamente).

**Tabla 1. Efecto de nicotinamida sobre ganancia de peso y consumo de calorías en ratas suplementados con nicotinamida y la administración de una dieta hipercalórica.**

	<i>CON</i>	<i>HC</i>	<i>HC-NAM5</i>	<i>HC-NAM10</i>	<i>HC-NAM15</i>
Peso inicial (g)	246 ± 3.3	249 ± 2.5	254.6 ± 3.3	247 ± 4	250.2 ± 2.2
Peso final (g)	460.2±13	491.3±29.9	478±24.2	422.3± 25.7	513±33.3
Ganancia de peso (g)	207 ± 14	241.7 ± 27	225 ± 25.4	179.3 ± 22	249.7 ± 31.7
Consumo alimento (g/semana)	172.6±6.3	<b>89±3.7<sup>&amp;</sup></b>	<b>110.7±5.4<sup>**</sup></b>	102.7±12.1	<b>125.7±4.8<sup>***</sup></b>
Consumo Carbohidrato (mL/semana)	-----	365±12.7	333.9±9.4	<b>309.8±16.7<sup>**</sup></b>	321.9±7.9
Calorías totales	580±14.2	<b>925.7±25.6<sup>&amp;</sup></b>	990.7±13.4	899.2±39.6	1022±53.5

Los valores representan la media ± desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey. <sup>&</sup>p<0.001 HC vs CON y <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15.

## 8.2. Curva de tolerancia a la glucosa

El metabolismo de glucosa no mostró alteraciones claras en el grupo HC con respecto al CON, así sustentado por la prueba de tolerancia de glucosa. El grupo HC tuvo un incremento en las concentraciones de glucosa a los 30 minutos de haberla administrado, pero mostrando un restablecimiento en las concentraciones de glucosa a partir de los 60 minutos y con concentraciones muy similares a las del grupo CON a los 120 minutos de la carga de glucosa. Los grupos HC-NAM 10 y 15 mM tuvieron un metabolismo de la glucosa similar al grupo CON, mientras el grupo HC-NAM 5 mM mostró alteraciones reflejando aumento en la concentración de glucosa por arriba de los 300 mg/dL a los 30 minutos, conservadas a los 60 minutos y con 170 mg/dL a los 120 minutos, sin alcanzar valores normales.

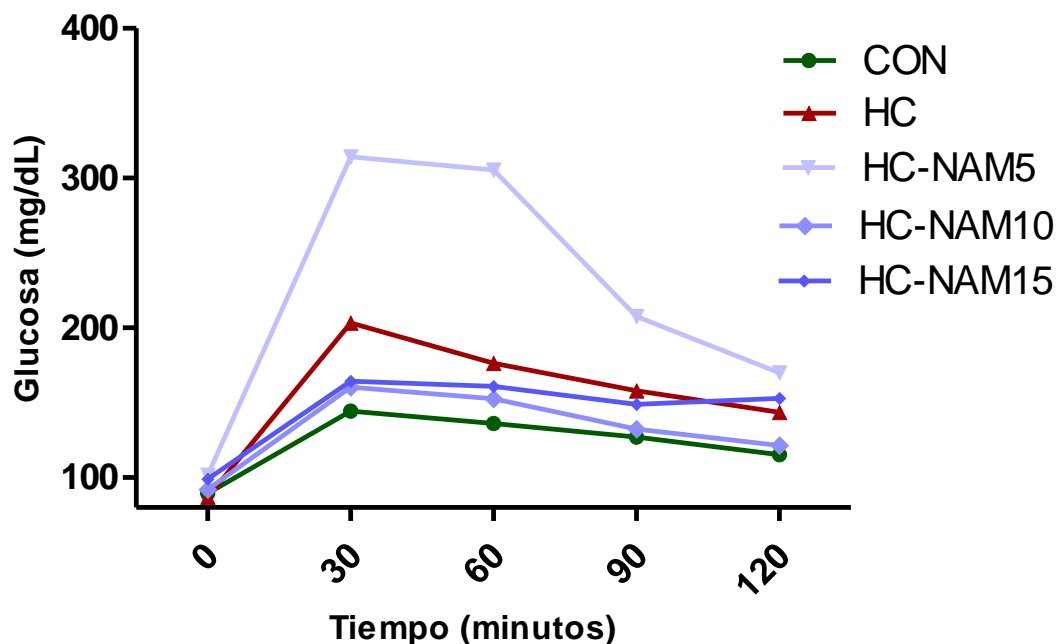


Figura 1. Efecto de la nicotinamida en el metabolismo de la glucosa en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica. Las líneas representan la media de 5 experimentos independientes por grupo.

### **8.3. Perfil bioquímico**

Los resultados obtenidos de la bioquímica en suero indican que el grupo HC no mostró cambios significativos en los diferentes parámetros evaluados; sin embargo el único cambio importante y significativo fue el aumento de triacilgliceroles (95%) con respecto al grupo CON.

Para el grupo HC-NAM 5 Mm, NAM redujo TG, LDL y VLDL significativamente (41, 23 y 41 %, respectivamente) con respecto al grupo HC. En el caso del grupo HC-NAM 10 mM mostró un decremento en las concentraciones de ALT (50%) comparado con el grupo HC, mientras el grupo HC-NAM 15 mM tuvo concentraciones disminuidas de CT y de ALT (12 y 50%, respectivamente) comparado con el grupo HC.

Los grupos HC-NAM 10 y 15 mM aumentaron sus concentraciones de TG al doble, mientras que sus concentraciones de VLDV-c en un 65 y 85% respectivamente cuando comparamos con el grupo CON.

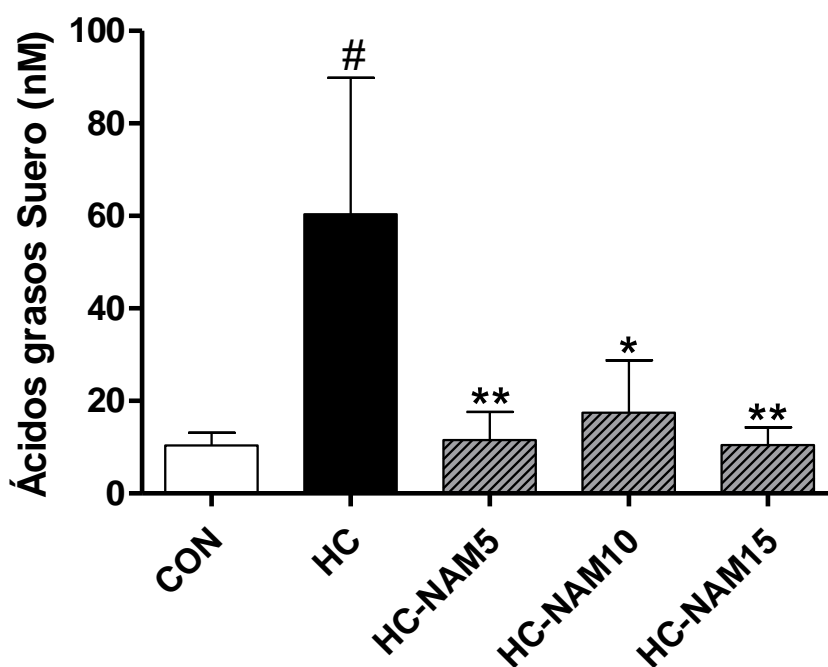
**Tabla 2. Efecto de la nicotinamida sobre el perfil bioquímico en rata alimentadas con dieta hipercalórica**

	<i>CON</i>	<i>HC</i>	<i>HC-NAM5</i>	<i>HC-NAM10</i>	<i>HC-NAM15</i>
TG mg/dL	66±11.5	<b>128.3±5.7<sup>ψ</sup></b>	<b>75.6±14.4*</b>	121.3±14.7	136.3±2.9
CT mg/dL	81.67±2.5	85.20±2	77.67±1.5	78.67±3.3	<b>75.33±1.7*</b>
HDL-c mg/dL	16.67±1.2	16±0.5	16.67±1.8	16.67±0.3	16.33±2.6
LDL-c mg/dL	47.3±2.1	44.27±1.7	<b>34.07±4.2 *</b>	36.8±3.8	<b>30.4±1.9*</b>
VLDL-c mg/dL	14.6±2.1	25.65±1.1	<b>15.1±2.8*</b>	24.27±2.9	27.2±0.5
ALT IU/L	78.33±10.7	108.0±19.5	89.67±6.4	<b>53.33±4.3 *</b>	<b>53.67±7.8*</b>
AST IU/L	42.33±5.8	37.67±6.6	25.67±8.6	29.67±3.4	32.66±14.4
GGT IU/L	10.20±0.2	14.6±3.8	11.00±0.7	11.20±1.2	10.50±0.5

Las barras representan la media ± desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey. <sup>ψ</sup>p< 0.01 HC vs CON y \*p<0.05 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15.

#### 8.4. Efecto de la nicotinamida sobre la concentración de ácidos grasos en suero

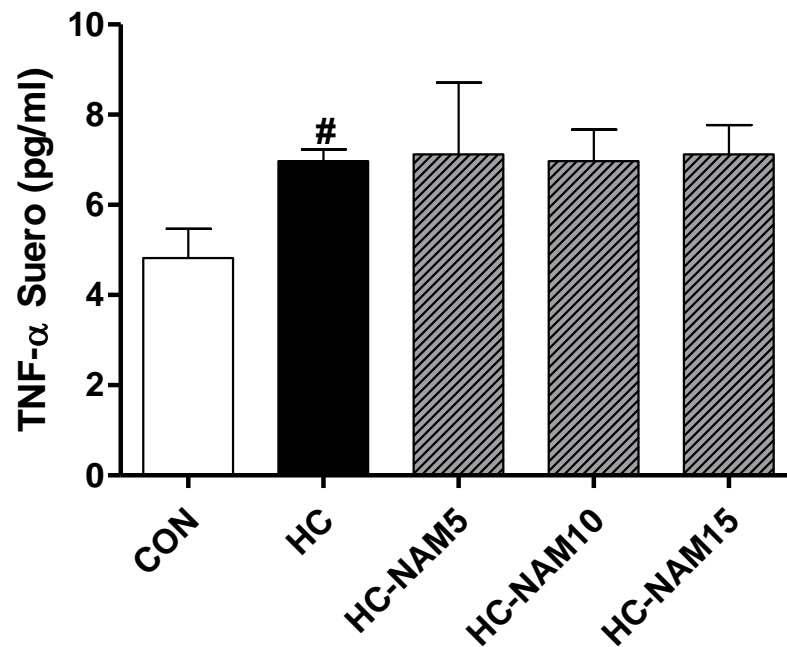
La concentración de ácidos grasos en el grupo HC fue 4 veces más elevada comparado con el grupo CON. En tanto los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 Mm mostraron concentraciones 4 veces menores comparados contra el grupo HC con significancia estadística y muy similares comparados contra el grupo CON.



**Figura 2. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de ácidos grasos libres en suero de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, # $p < 0.05$  CON vs HC; \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

### 8.5. Efecto de la nicotinamida sobre marcadores de inflamación

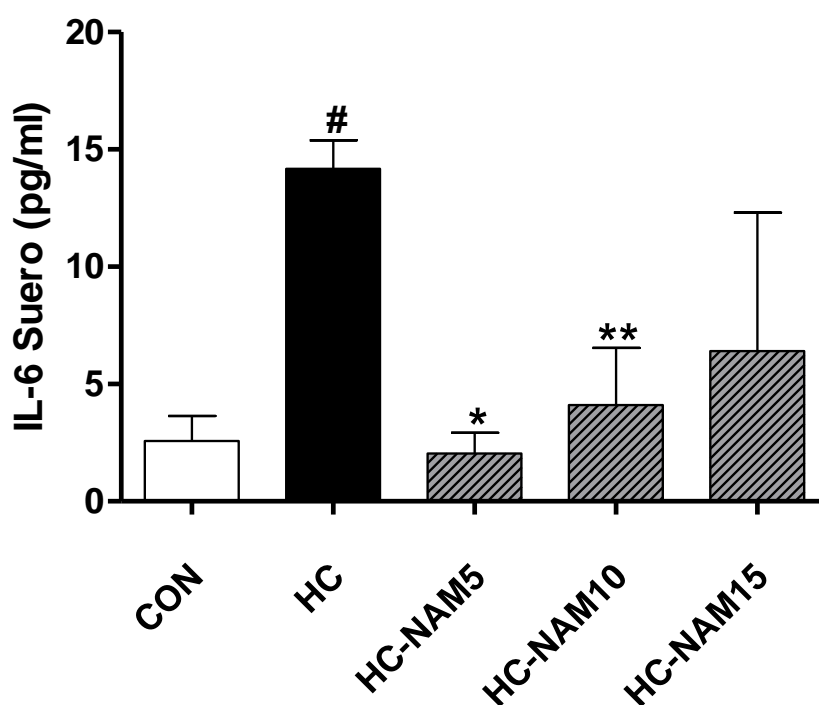
Las concentraciones de TNF- $\alpha$  aumentaron un 44% en el grupo HC cuando comparamos contra el grupo CON mostrando diferencia significativa. Mientras los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 mM no mostraron cambios cuando se compararon contra el grupo HC.



**Figura 3. Efecto de la nicotinamida sobre los niveles de TNF- $\alpha$  en suero de animales que consumieron una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, <sup>#</sup>p <0.05 CON vs HC. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

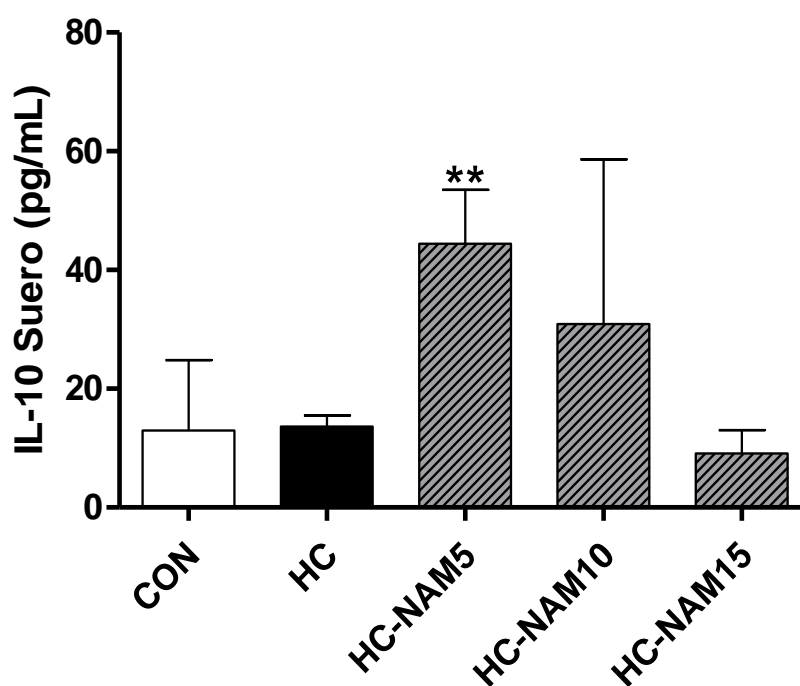


Las concentraciones de IL-6 aumentaron significativamente (4.5 veces más) en el grupo HC con respecto al grupo CON, mientras en los grupos HC-NAM 5 y HC-NAM 10 mM disminuyeron (6 y 2.5 veces, respectivamente) cuando se compararon contra el grupo HC. No obstante que el grupo HC- NAM 15 mM mostró concentraciones menores con respecto al grupo HC, sin ser estadísticamente significativamente. Los grupos que HC-NAM 5 y 10mM mostraron valores similares al grupo CON.



**Figura 4. Efecto de la nicotinamida sobre los niveles de IL-6 en suero de animales que consumieron una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, # $p < 0.05$  CON vs HC; \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  HC vs HC-NAM5 y HC-NAM10. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

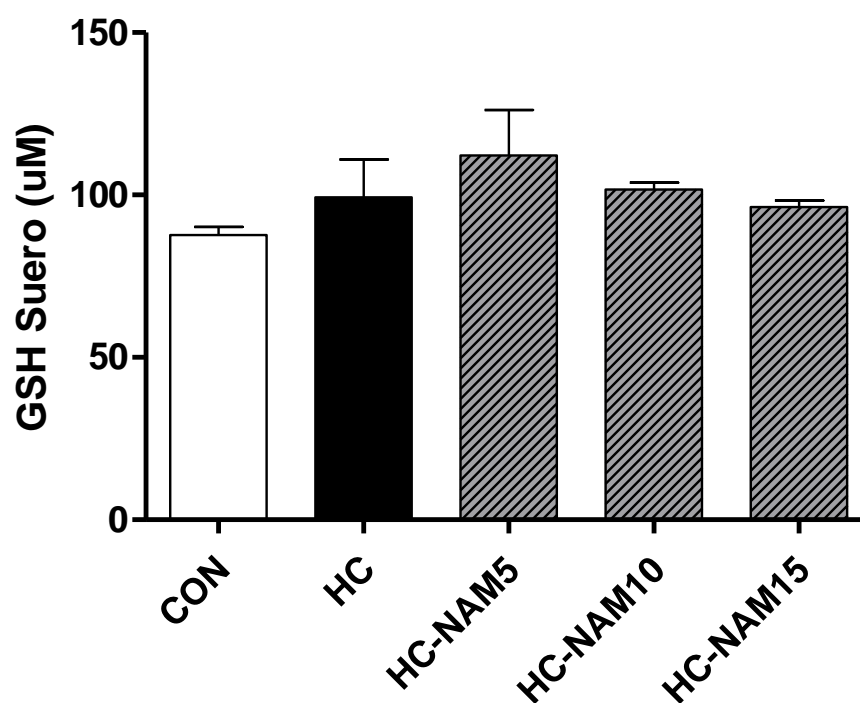
La concentración de IL-10 en el grupo HC mostró valores similares con el grupo CON. Cuando se comparan los grupos con dieta HC suplementados con NAM a las diferentes dosis con respecto al grupo HC; el grupo HC-NAM 5 mM incrementó significativamente 2.25 veces mostrando diferencia significativa, mientras el grupo HC-NAM 10 manifestó una tendencia a incrementar sus concentraciones sin mostrar diferencia significativa, para el grupo HC-NAM 15 mM no hubo cambios.



**Figura 5. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de IL-10 en suero en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, \*\*p <0.01 HC vs HC-NAM5. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

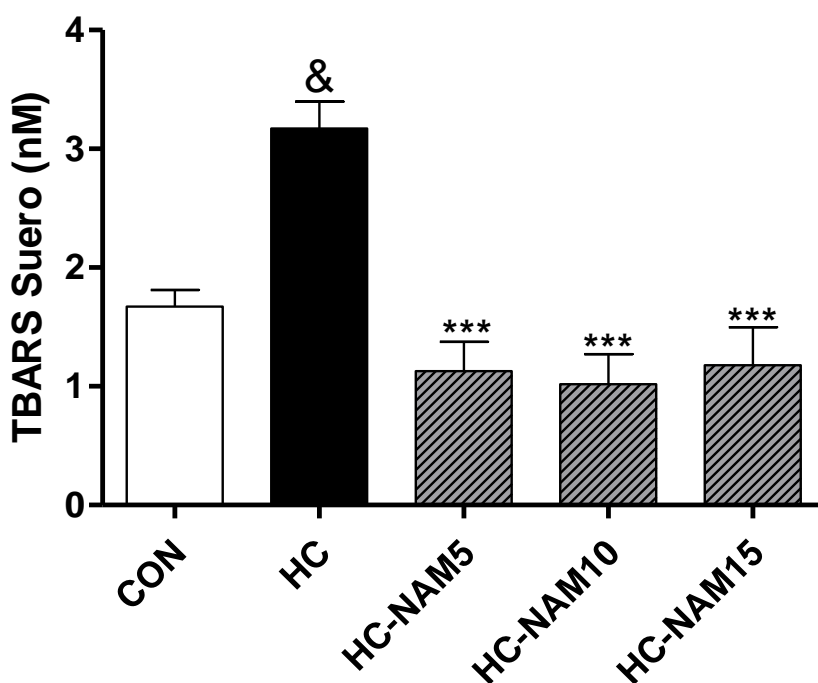
### 8.6. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de GSH y TBARS en suero

La concentración de GSH en suero en el grupo HC mostró un aumento con respecto al grupo CON, sin diferencia significativa. Cuando se analizaron los grupos HC-NAM5, 10 y 15 mM con el grupo HC las concentraciones de GSH tampoco mostraron cambios importantes. Del mismo modo sin cambios cuando se comparan los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 mM con el grupo CON.



**Figura 6. Efecto de nicotinamida sobre las concentraciones de GSH en suero en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

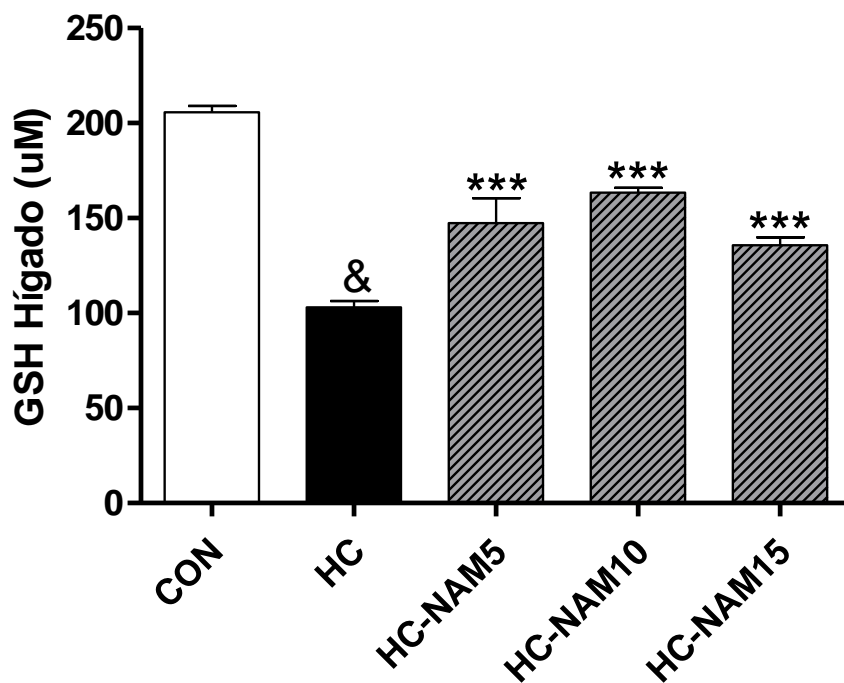
La determinación de TBARS en suero, marcador del grado de lipoperoxidación, evidenció que el grupo HC aumentó significativamente aproximadamente al doble (94%) las concentraciones de TBARS en suero comparado con el grupo CON, mientras que cuando se compararon los grupos HC-NAM5, 10 y 15 mM con aquellos del grupo HC, se observó que las concentraciones de TBARS disminuyeron dos terceras partes (65%) con cada uno de los grupos, mostrando diferencias significativas y con valores similares con el grupo CON.



**Figura 7. Efecto de nicotinamida sobre los niveles de TBARS en suero en ratas que consumieron una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p <0.001 CON vs HC; \*\*\* p <0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

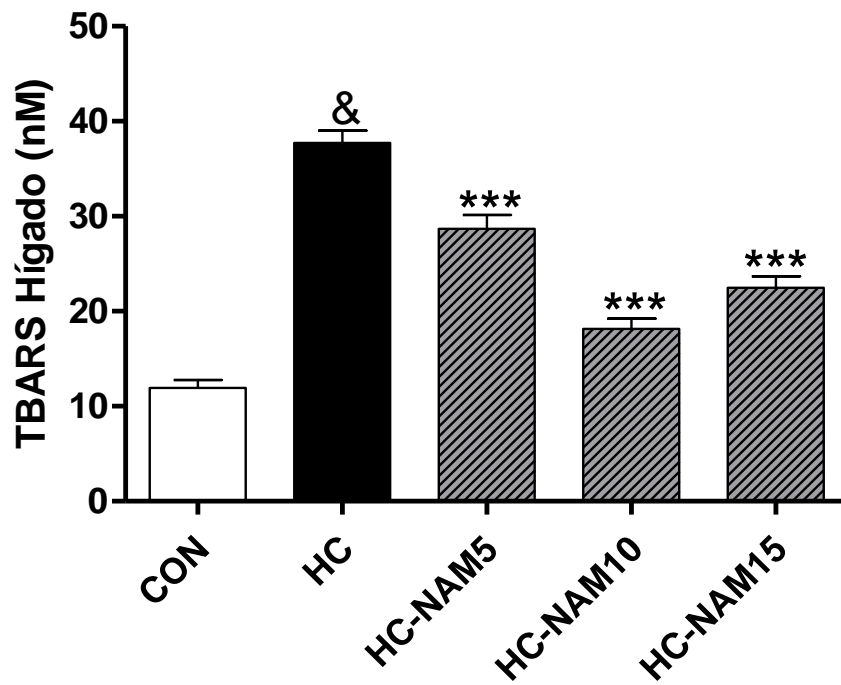
### 8.7. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de GSH y TBARS hepáticas en rata

El consumo de una dieta hipercalórica (grupo HC) provocó un descenso significativo de un 50% en la concentración de GSH hepática con respecto al grupo CON. Cuando, se comparó los grupos suplementados con NAM respecto al grupo HC los datos mostraron un incremento significativo de GSH en los HC-NAM 5 mM (43%), HC-NAM 10 mM (58%) y HC-NAM 15 mM (31%).



**Figura 8. Efecto de la nicotinamida en sobre las concentraciones de glutatión en hígado de ratas que consumieron una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p <0.001 CON vs HC; \*\*\* p <0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

Las concentraciones de TBARS en hígado se observaron incrementadas 3 veces en el grupo HC comparado con el grupo CON. Los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 mM mostraron un descenso de TABARS hepáticos del 25, 52 y 41% respectivamente, comparados contra el grupo HC con diferencia significativa.



**Figura 9. Efecto de nicotinamida sobre las concentraciones de TBARS en hígado de ratas que consumieron una dieta hipercalórica** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p <0.001 CON vs HC; \*\*\* p <0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

### 8.8. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de GSH y TBARS en hipocampo

Las concentraciones de GSH en el hipocampo del grupo HC, disminuyeron (65%) cuando se comparan con el grupo CON, manifestando diferencia significativa; mientras las concentraciones de GSH aumentan en los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 Mm cuando se comparan con el grupo HC, los incrementos fueron de 1.5 veces más mostrando diferencia significativa y concentraciones similares al grupo control.

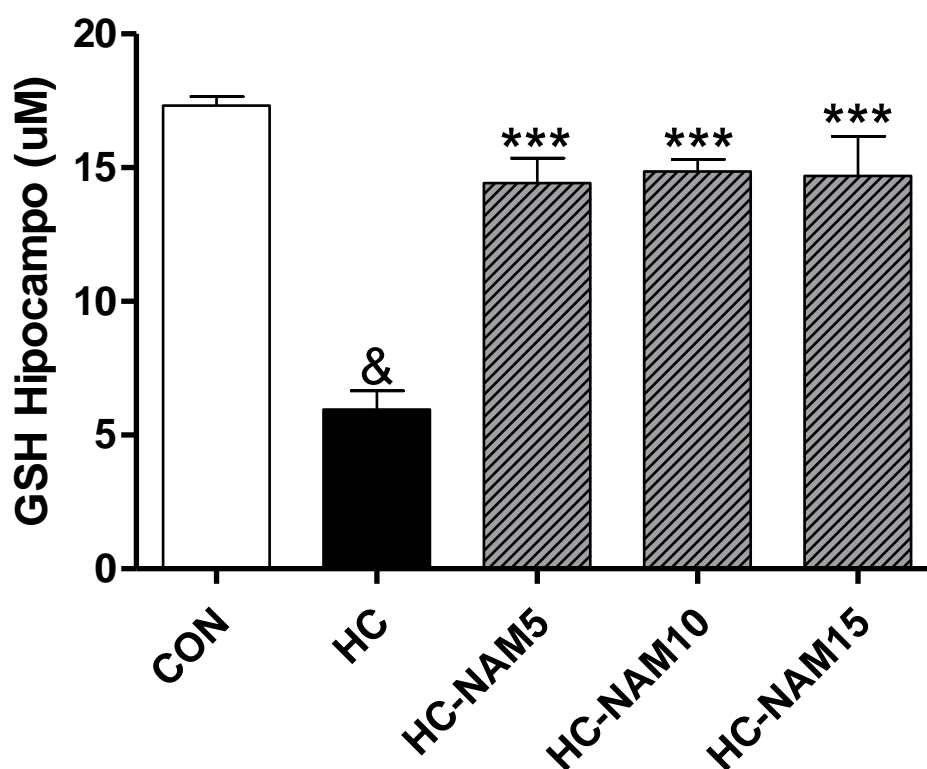
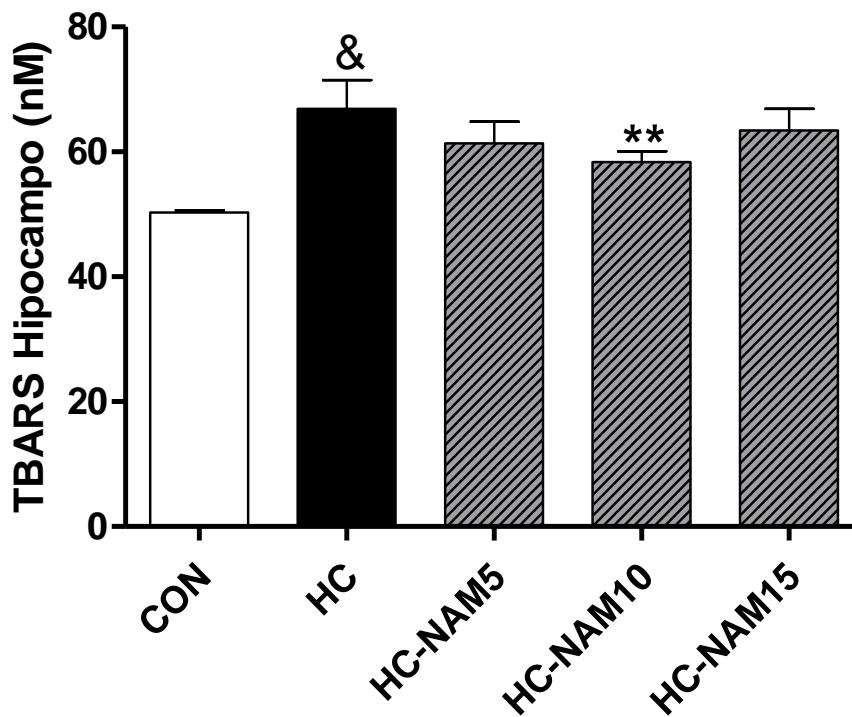


Figura 10. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de GSH en hipocampo de ratas expuestas a una dieta hipercalórica. Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p <0.001 CON vs HC; \*\*\* p <0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

Al determinar las concentraciones de TBARS en el hipocampo, los animales del grupo HC aumentaron significativamente (33%) al compararse con el grupo CON. En el caso de las concentraciones de TBARS en el grupo HC-NAM10 mM se observó un decremento significativo (13%) con respecto al grupo HC, los grupos de HC-NAM 5 y 15 mM redujeron sus niveles de TBARS con respecto al grupo HC pero sin mostrar diferencia significativa.

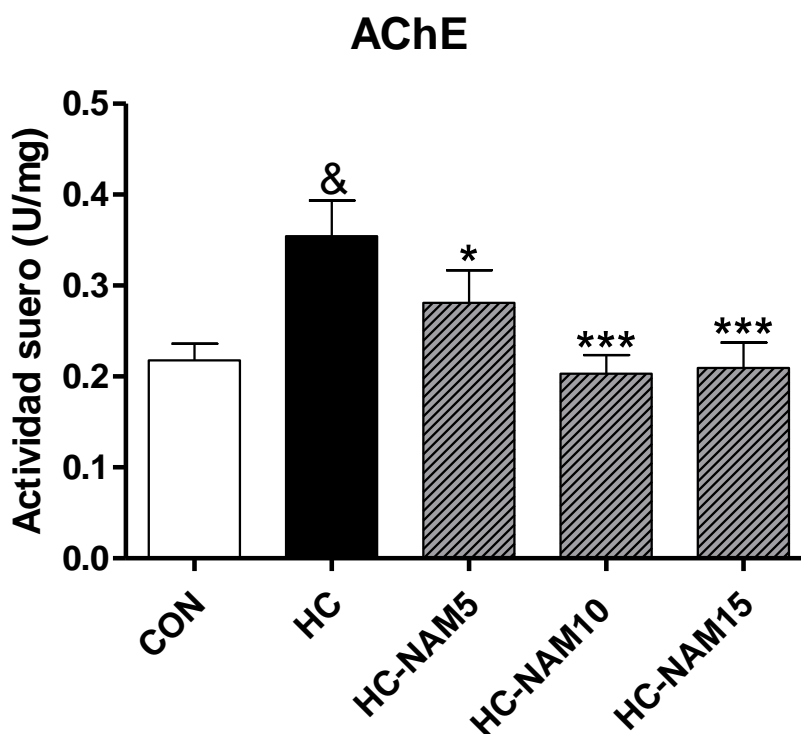


**Figura 11. Efecto de nicotinamida sobre las concentraciones de TBARS en hipocampo de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p < 0.001 CON vs HC; \*\*p < 0.001 HC vs HC-NAM10. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.



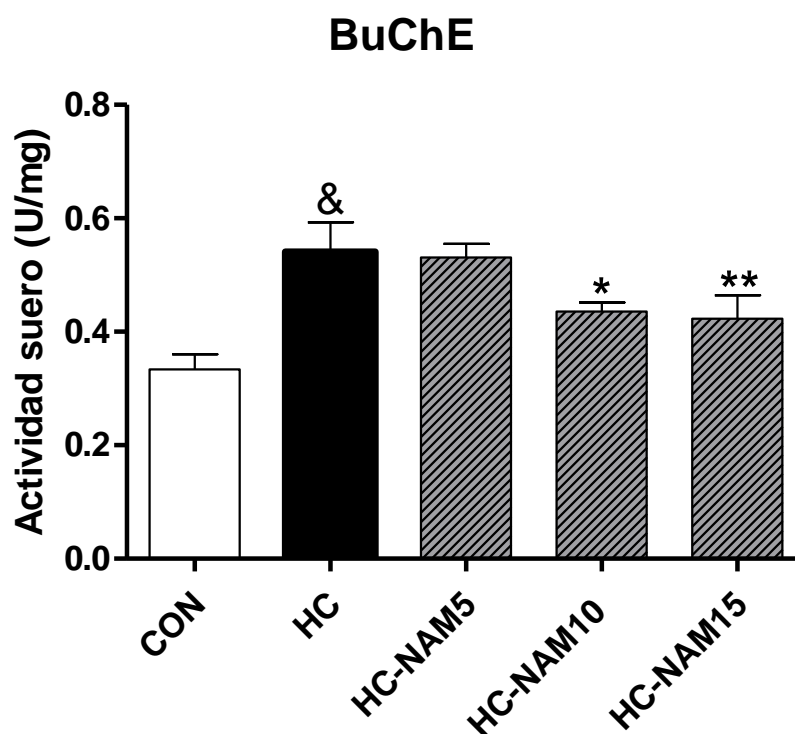
### 8.9. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad específica de las colinesterasas séricas

La actividad específica de AChE en suero del grupo HC aumentó 66% comparado con el grupo control siendo estadísticamente significativo. Los grupos HC-NAM5, 10 y 15 mM mostraron una actividad específica disminuida (20, 43 y 42%, respectivamente) al compararlos con el grupo HC mostrando diferencia significativa y concentraciones similares al grupo control.



**Figura 12. Modulación de la actividad específica de AChE sérica por nicotinamida en ratas expuestas a una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p <0.001 CON vs HC; \*p <0.05, \*\*\* p <0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

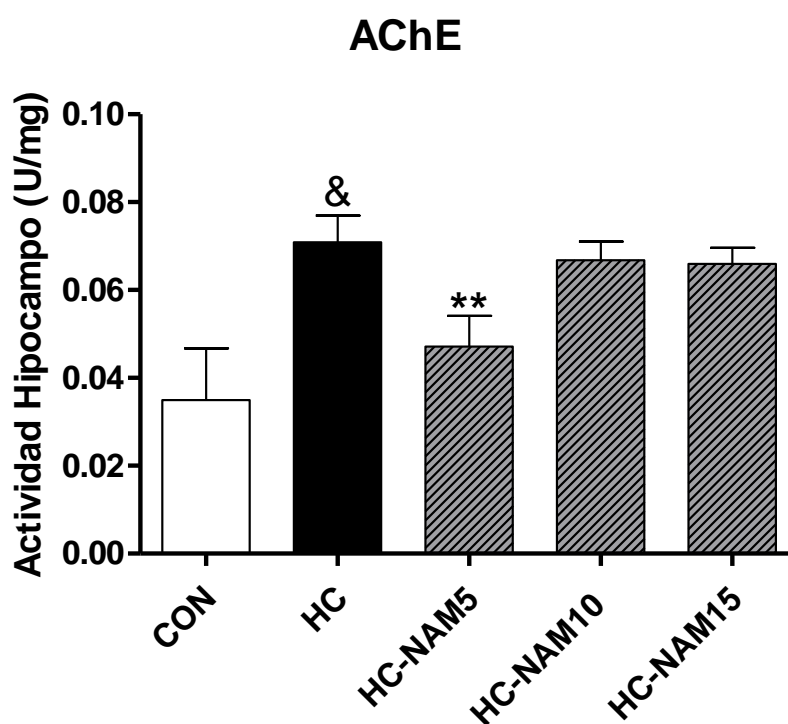
En el grupo HC la actividad de BuChE aumentó (63%) con respecto al grupo CON significativamente. El análisis estadístico de la actividad específica de BuChE en los grupos suplementados con NAM con respecto al grupo HC, solo los grupos HC-NAM 10 y 15 mM disminuyeron (20% y 22%, respectivamente) significativamente mostrando valores similares con el grupo control.



**Figura 13. Modulación de la actividad específica de BuChE en suero por la administración de nicotinamida en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p <0.001 CON vs HC; \*p <0.05, \*\*p <0.01 HC vs HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

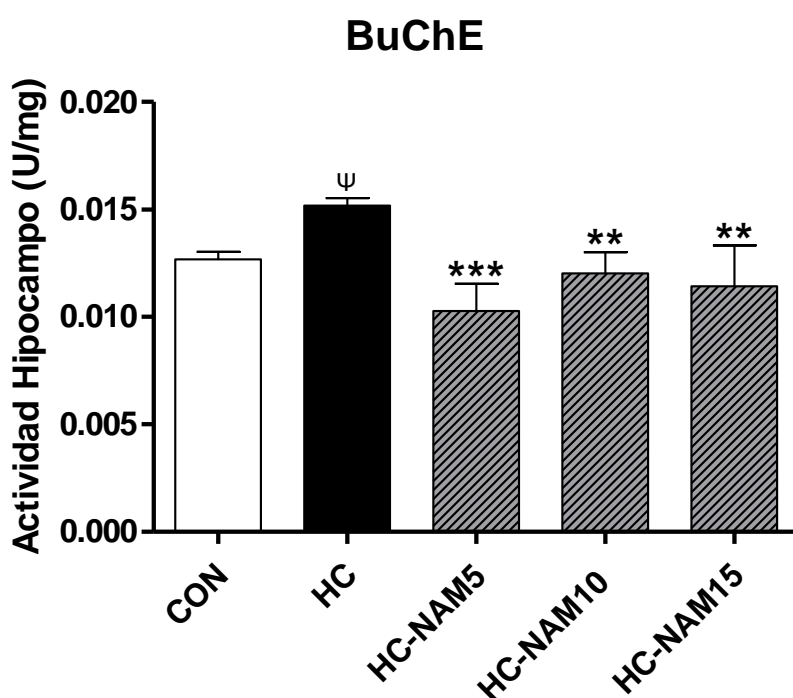
### 8.10. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad específica de las colinesterasas en hipocampo

En el grupo de animales HC, la actividad específica de AChE en hipocampo se duplicó con respecto al grupo CON. Sin embargo, cuando se comparó aquellos grupos a los cuales se les administro la dieta HC más NAM respecto al grupo HC, solamente el grupo HC-NAM5 mM tuvo un decremento del 33%, siendo estadísticamente significativo y con valores muy similares a los del grupo CON. Los grupos HC-NAM10 y HC-NAM15 mM no disminuyeron la actividad específica con respecto al grupo HC.



**Figura 14. Modificación de la actividad específica de AChE en hipocampo mediante la administración de nicotinamida en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo, &p <0.001 CON vs HC; \*\* p <0.01 HC vs HC-NAM5. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

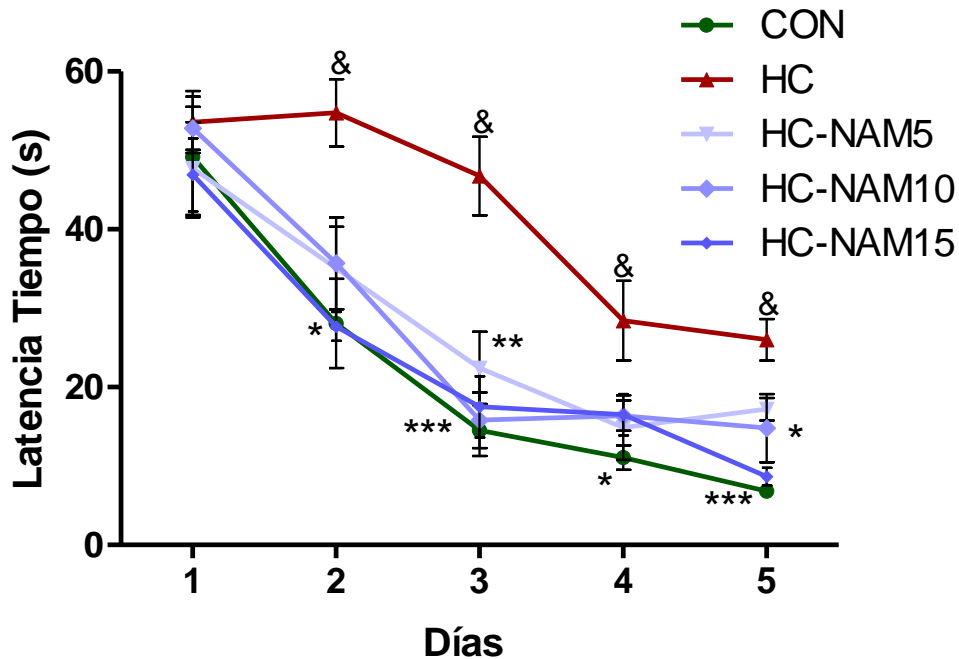
En las ratas del grupo HC, la actividad de BuChE en hipocampo incrementó significativamente (25%) comparado con el grupo CON. Los grupos suplementados con la dieta HC más NAM tuvieron un decremento en la actividad; para HC-NAM5 mM fue 34%, HC-NAM10 mM el 20% y HC-NAM15 mM del 27% comparados con el grupo HC mostrando diferencia significativa y concentraciones similares al grupo control.



**Figura 15. Modulación de la actividad específica de BuChE en hipocampo por la administración de nicotinamida en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo,  $\Psi p < 0.01$  CON vs HC; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

### 8.11. Evaluación del aprendizaje en ratas

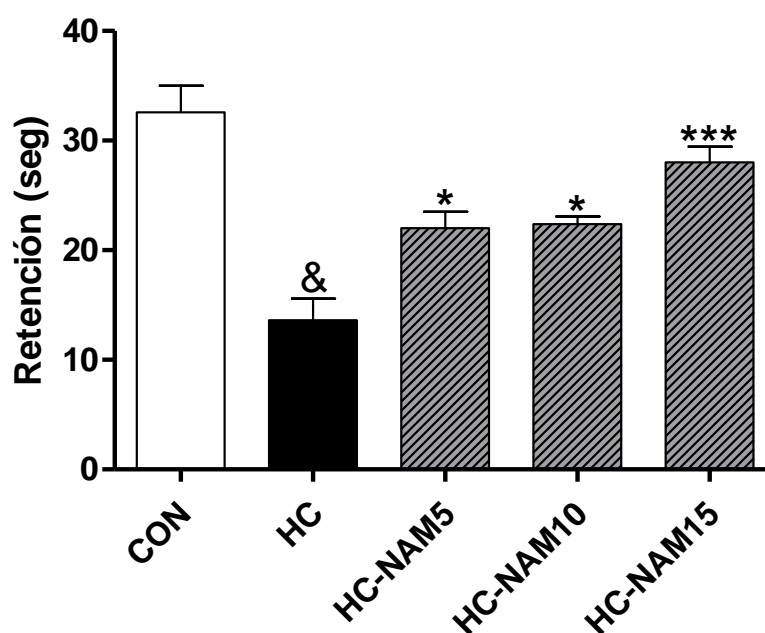
Los resultados obtenidos en la prueba de memoria y aprendizaje espacial indicaron que en los días 2, 3, 4 y 5 de entrenamiento el grupo HC tardó más tiempo en encontrar la plataforma comparado con el grupo CON, mostrando diferencia significativa en cada uno de esos días. Cuando se comparan los grupos HC-NAM 5, 10 y 15 mM contra el grupo HC se observó que con el suplemento de NAM, las ratas encuentran la plataforma en menor tiempo durante los días de entrenamiento siendo estadísticamente significativo y con un comportamiento similar al grupo CON.



**Figura 16. Efecto de la administración de nicotinamida sobre el aprendizaje de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Las líneas representan la media  $\pm$  error estándar de 5 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey. &p<0.001 HC vs CON; \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p< 0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15.

### 8.12. Efecto de nicotinamida sobre la prueba de retención de memoria

Los resultados de la prueba de retención de memoria indican que el grupo HC nadó sobre el cuadrante donde se encontraba la plataforma 13 segundos, 1.4 veces menos tiempo que el grupo CON. Los grupos con la dieta HC-NAM incrementaron el tiempo de nado sobre el cuadrante donde se encontraba la plataforma en comparación con el grupo HC. Los grupos; HC-NAM5 y 10 mM aumentaron el tiempo a 22 segundos (9 segundos más) y el grupo HC-NAM 15 mM más del doble de tiempo (28 segundos), mostrando para los tres grupos diferencia significativa.



**Figura 17. Efecto de la administración de nicotinamida sobre la retención de la memoria en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.** Las líneas representan la media  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey. &p<0.001 HC vs CON; \*p<0.05 y \*\*\*p< 0.001 HC vs HC-NAM5, HC-NAM10 y HC-NAM15.

## 9. DISCUSIÓN

Las evidencias obtenidas del presente estudio demuestran, que a pesar del consumo de una dieta hipercalórica no provocó ganancia de peso, alteración en el metabolismo de glucosa, ni cambios en el perfil bioquímico a excepción de aumento en los triacilgliceroles y ácidos grasos libres. Sin embargo, la sobre carga calórica en suero incrementó las actividades de AChE y BChE, las concentraciones de IL-6, TNF- $\alpha$  y TBARS, junto con una reducción de IL-10.

A nivel de hipocampo, las colinesterasas junto con las concentraciones TBARS aumentaron con una marcada reducción del GSH. En el hígado aumentó TBARS y disminuyó GSH. Todas estas alteraciones se ven reflejadas con deterioro cognitivo. En contraste la administración de NAM regula la actividad de las colinesterasas y disminuye la inflamación sistémica, tanto en suero como en hipocampo, a través de disminuir TBARS, aumentar IL-10 y restablecer el GSH a nivel sérico, hipocampo y en el hígado atenuando el deterioro cognitivo producido por los efectos del consumo de una dieta hipercalórica.

El consumo frecuente de alimentos con altas concentraciones de carbohidratos y/o grasas saturadas son la principal causa del sobrepeso u obesidad, que conlleva al inicio, progreso y establecimiento de las enfermedades crónico degenerativas (Marseglia et al., 2014; Tófolo et al., 2019). A partir de la década de los 80's del siglo pasado surgieron conceptos para explicar los fenotipos de individuos obesos y no obesos metabólicamente saludables y no saludables, aquí surge el concepto de individuos con peso normal pero metabolismo alterado, es decir los individuos deberían presentar alteraciones en triacilgliceroles, de insulina y una inflamación

sistémica, entre otros. Hasta la fecha no queda claro cuáles deben ser los criterios para clasificar a estos individuos; ya que es muy común que solo presenten algunas alteraciones, aunque estas alteraciones pueden ser distintas dependiendo del origen étnico, así como vías fisiológicas de la adipogénesis, disfunción e inflamación del tejido adiposo, infiltración de macrófagos en tejido adiposo, además de acumulación ectópica de grasa y disfunción mitocondrial contribuyendo a la heterogeneidad metabólica (Wang et al., 2016; Jung et al., 2017; Huang et al., 2018).

En el modelo experimental desarrollado, en el grupo HC no hubo un incremento de peso significativo con respecto al control que pueda clasificarse como obesidad por la sobre carga de calorías consumidas, aunque sí se observó diferencias en la ganancia de masa grasa con respecto a la masa muscular. Si se compara a los animales que consumieron la dieta hipocalórica con respecto a la dieta estándar se observó mayor cantidad de tejido adiposo almacenado en la región abdominal en el grupo HC, consecuencia del elevado aporte calórico, mientras el consumo de la dieta estándar presenta mayor masa muscular y poca ganancia de grasa abdominal. Para clasificar la obesidad es común utilizar el índice de masa corporal (IMC) como marcador que sustituye a la masa grasa asociándolo con factores de riesgo de enfermedades metabólicas. Es importante destacar que la relación entre el IMC y la masa grasa corporal no es precisa para estimar el grado de adiposidad de un individuo, ya que no se tiene en cuenta la masa muscular esquelética y tomando en cuenta que el verdadero factor de riesgo para la salud es la cantidad de grasa, el uso del IMC es inadecuado (Goossens, 2017).



El hecho de no presentar un fenotipo de obesidad podría justificar que los animales del grupo HC no hayan manifestado dislipidemias, pruebas alteradas del funcionamiento hepáticas, ni mostrar una clara alteración en el metabolismo de la glucosa, también podría deberse a la necesidad de un tiempo de exposición más prolongado a la dieta. Similar a los resultados de este estudio; reportes realizados en modelos de obesidad muestran que las determinaciones bioquímicas tampoco tienen cambios en varios de estos parámetros, por lo que no queda claro el nivel de adiposidad o de daño por las dietas para que estos parámetros se vean alterados. No obstante, el hecho de incrementar la cantidad de tejido adiposo, debido al elevado consumo energético es prueba de un metabolismo alterado, justificado por los niveles elevados de triacilgliceroles y que podría reflejar una hipertrofia del tejido adiposo originando la liberación de citocinas pro-inflamatorias, AGL y ERO a la circulación (Goossens, 2017), justificando el aumento de IL-6, TNF- $\alpha$ , AGL y TBARS séricos en el grupo HC.

La expansión del tejido adiposo del grupo HC puede deberse a un efecto concertado entre el hígado y tejido adiposo. La primera alteración posiblemente ocurre a nivel hepático; ya que la sacarosa administrada estimula la síntesis de ácidos grasos libres y la subsecuente formación de triacilgliceroles. La acumulación de lípidos en el hígado propicia la lipoperoxidación y con ello un ambiente oxidante, así sustentado por el aumento de TBARS y decremento de GSH. Las concentraciones bajas de GSH puede deber al aumento de ERO, así como la salida del péptido para abastecer a órganos y tejidos periféricos, explicando con esto por qué no se observaron variaciones séricas de GSH.

Los triacilgliceroles hepáticos liberados a la circulación en forma de VLDL, estimulan la adipogénesis del tejido adiposo generando su acumulación, y con ello hipertrofia y disfunción hormonal. Estos procesos estimulan una inflamación sistémica de bajo grado manifestada por aumento de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Este aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias es una característica importante de la acumulación excesiva de tejido adiposo generando mediante la infiltración de macrófagos la síntesis y liberación de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Rogero & Calder, 2018), acorde con el aumento de IL-6 sérica del grupo HC.

La deficiencia cognitiva inducida por el consumo de dietas altas en carbohidratos o grasa saturadas ha sido reportada, dándole énfasis al estrés oxidante, la inflamación sistémica y a los ácidos grasos saturados en circulación, que a través de diferentes mecanismos pueden afectar la integridad de la BHE e iniciar un proceso de neuroinflamación favoreciendo el deterioro cognitivo (Pallebage et al., 2012; Lin et al., 2017). En este sentido el aumento de IL-6, TBARS y AGL en el grupo HC fue determinante para el deterioro cognitivo; ya que el ensayo de el laberinto acuático de Morris estuvo alterada indicando que la habilidad en la retención de memoria fue afectada.

El estrés oxidante como consecuencia de la hipertrofia en tejido adiposo por el consumo de alimentos con alto valor energético se manifestó en un incremento en las TBARS en suero. Las TBARS en forma de 4-hidroxi-nonenal y MDA son moléculas formadas como producto de la oxidación de lípidos por un incremento de ERO, unas de los principales orquestadores en el deterioro cognitivo y que puede afectar a distintos niveles (Jiménez et al., 2006). El incremento de TBARS en suero es evidencia

del estrés oxidante sistémico, que tiene la capacidad de afectar la integridad de la barrera hematoencefálica a través de oxidar las proteínas que conforman las uniones estrechas (claudinas, ocludinas, ZO) ocasionando pérdida de su funcionalidad y en consecuencia un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con posibilidad de que las ERO, citocinas pro-inflamatorias, AGL y LPS lleguen a diferentes regiones del SNC (Lehner et al., 2011; Rhea et al., 2017; Pugazhenthii et al., 2017). En este sentido, existen reportes que la administración de una dieta hipercalórica incrementan el estrés oxidante y la inflamación en regiones del cerebro como, corteza e hipocampo viéndose afectada la memoria y el aprendizaje.

Las observaciones del presente estudio son acordes con lo reportado en investigaciones realizadas con dietas experimentales altas en grasas o en carbohidratos. Con base a nuestros resultados, el consumo de la dieta hipercalórica aumentó las concentraciones de TBARS en hipocampo, mientras las concentraciones de GSH se vieron abatidas, lo que indica vulnerabilidad de las neuronas y células gliales del hipocampo a la oxidación de lípidos y proteínas; así como modificaciones en el DNA irrumpiendo en su funcionalidad y favoreciendo el deterioro cognitivo.

La actividad aumentada de las colinesterasas en suero e hipocampo por el consumo de una dieta hipercalórica ha sido reportada en estudios previos. La actividad de las colinesterasas se relaciona con la inflamación, ya que el neurotransmisor ACh al unirse a su receptor nicotínico en la subunidad  $\alpha 7$  de los macrófagos actúa como una molécula anti-inflamatoria evitando la producción y liberación de citocinas pro-inflamatorias. En este contexto el aumento en la actividad de las colinesterasas

hidroliza ACh evitando que lleve a cabo su actividad anti-inflamatoria y favoreciendo la inflamación sistémica (Lane et al., 2006). Por otra parte, se sugiere que en SNC podría llevarse a cabo el mismo evento: ya que los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  se encuentran principalmente en astrocitos, por lo que los bajos niveles de ACh como consecuencia de su elevada hidrólisis por las colinesterasas exacerba la neuroinflamación favoreciendo el deterioro cognitivo (Graham, et al., 2003; Amin et al., 2011; Nea et al., 2014). Para poder ser biofuncionales, las colinesterasas llevan a cabo un proceso de modificación pos-traducciona conocido como glicosilación en retículo endoplásmico. El estrés oxidante y la inflamación pueden generar estrés de retículo endoplásmico en cerebro, por lo que las colinesterasas pueden experimentar alteraciones en su patrón de glicosilación afectando su actividad, la cual en nuestro modelo de estudio se ve aumentada en hipocampo (Sprenkle et al., 2017; Liu et al., 2019).

La NAM al ser un precursor de las coenzimas; NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, NADPH, se le han atribuido funciones anti-inflamatorias, antioxidantes, incrementa las concentraciones de ATP, así como varios procesos del metabolismo celular. En nuestro modelo del estudio la administración de NAM aumentó las concentraciones de IL-10 en suero, GSH en hígado e hipocampo, mientras disminuyó las concentraciones de IL-6 y TBARS en suero, hígado e hipocampo, y la actividad de las colinesterasas en hipocampo y suero. El efecto anti-inflamatorio de nicotinamida es ejercido a partir del aumento en las concentraciones de la coenzima NAD<sup>+</sup> la cual es utilizada como sustrato de un grupo de enzimas desacetilasas de histonas conocidas como sirtuínas (SIRTs) provocando un aumento en su actividad e inhiba la formación del complejo NF- $\kappa$ B y no se lleve a cabo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, por consiguiente

no haya un aumento excesivo en moléculas relacionadas con la inflamación sistémica (Pugazhenthii et al., 2017).

El efecto antioxidante de NAM queda demostrado a través del restablecimiento de GSH, lo cual probablemente es reflejo del aumento de NADPH producido en la vía de las pentosas fosfato por el consumo de sacarosa. El NADPH es utilizado por la glutatión reductasa quién recicla el GSH a partir de GSSG (glutatión Oxidado) lo que genera un aumento en la capacidad antioxidante celular disminuyendo el estrés oxidante. Efecto evidente por las concentraciones bajas de TBARS en suero e hipocampo y el restablecimiento de GSH en hipocampo. Paralelo a eso, el estrés oxidante y concentraciones bajas de ATP son causa primordiales para que se establezcan las enfermedades neurodegenerativas asociadas con déficit cognitivo, en esta línea se cuenta con información de que NAM aumenta las concentraciones de ATP, a través de incrementar las concentraciones de NAD<sup>+</sup>, necesaria en el metabolismo celular para la formación de NADH que a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial es utilizada para la síntesis de ATP. Con esta apreciación NAM ejerce un efecto antioxidante en el presente estudio al restablecer las concentraciones de GSH y evitar que las ERO ejerzan efectos deletéreos sobre componentes neuronales y aumentar los niveles de ATP necesarios para el metabolismo neuronal, previniendo el deterioro cognitivo en ratas tratadas con una dieta hipercalórica (Weiss et al., 2015; Fricker et al., 2018).

Las Investigaciones realizadas en enfermedades neurodegenerativas han demostrado que el incremento del estrés oxidante correlaciona con el aumento de la actividad de las colinesterasas. Por lo que se menciona, esta condición contribuye a disminuir las

concentraciones de ACh afectando la sinapsis y los procesos cognitivos. Tomando en cuenta esta condición, se han utilizado diversas moléculas con propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias disminuyendo la actividad de las colinesterasas, confirmando con ello que regular el estrés oxidante es clave para la vía colinérgica y el restablecimiento de la sinapsis cerebral. A pesar que en la actualidad, se utilizan inhibidores de las colinesterasas para aumentar los niveles de ACh, estos no han sido del todo efectivos, ya que el estrés oxidante persiste. Por ello y en base a los resultados obtenidos del presente estudio, nicotinamida puede ser efectiva en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas por su efecto antioxidante y modulador en la actividad de las colinesterasas.

## **10. CONCLUSIÓN**

La ingesta crónica de una dieta hipercalórica en ratas a pesar de no inducir obesidad ni alterar los parámetros bioquímicos comunes de esta enfermedad, originó AGL, inflamación sistémica crónica de bajo grado y estrés oxidante como productos de un metabolismo alterado en tejido adiposo, factores de relevancia que contribuyen a un incremento en la actividad de las colinesterasas en hipocampo y a la progresión de enfermedades crónico degenerativas, entre ellas el déficit cognitivo.

La acumulación de tejido adiposo generada por una dieta hipercalórica en ratas es la causante de liberación de moléculas a circulación provocando neuroinflamación y alteando la actividad de las colinesterasas en hipocampo que a su vez altera la sinapsis provocando deterioro cognitivo. Opuesto a esto, la administración de nicotinamida disminuye la inflamación sistémica y el estrés oxidante provocados por la dieta

hipercalórica mediante el restablecimiento de las concentraciones de GSH y decremento de TBARS en hipocampo. Además de regular la actividad de las colinesterasas previniendo el deterioro cognitivo en ratas.

Los mecanismos mediante los cuales nicotinamida protege contra la inflamación y el estrés oxidante ha sido reportada, sin embargo, no queda clara su función sobre la actividad de las colinesterasas, así como tampoco se sabe si su principal efecto protector es a nivel sistémico, de proteger la integridad de la BHE o bien directamente sobre el restablecimiento del metabolismo celular en el SNC.

Es por eso la importancia de investigar más sobre el efecto de nicotinamida a nivel de BHE y de SNC, así como su efecto sobre la actividad de las colinesterasas. En el marco actual del conocimiento científico, nicotinamida podría ser un excelente candidato como suplemento para prevenir o como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por lo que es de gran importancia seguir investigando sobre su función neuroprotectora. Además de que en la mayoría de estudios relacionados a enfermedades neurodegenerativas se enfocan en la acumulación de la proteína beta-amiloide y la muerte neuronal, dejando a un lado la importancia de aquellas moléculas de origen sistémico como ERO o la inflamación sistémica generadas por las dietas, además de la integridad de la BHE ante la protección del SNC.

## 11. REFERENCIAS

Amin, K. A., Kamel, H. H., & Abd, Eltawab, M. A. (2011). The relation of high fat diet, metabolic disturbances and brain oxidative dysfunction: modulation by hydroxy citric acid. *Lipids in health and disease*, 10, 74.

Bednarska-Makaruk, M., Graban, A., Wiśniewska, A., Łojkowska, W., Bochyńska, A., Gugąła-Iwaniuk, M., ... Wehr, H. (2017). Association of adiponectin, leptin and resistin with inflammatory markers and obesity in dementia. *Biogerontology*, 18(4), 561–580.

Boitard, C., Parkes, S. L., Cavaroc, A., Tantot, F., Castanon, N., Layé, S., ... Ferreira, G. (2016). Switching Adolescent High-Fat Diet to Adult Control Diet Restores Neurocognitive Alterations. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 10, 225.

Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M. T., Campoy, F. J., & Vidal, C. J. (2002). Glycosylation of Acetylcholinesterase Forms in Microsomal Membranes from Normal and Dystrophic Lama2dy Mouse Muscle. *Journal of Neurochemistry*, 69(5), 1964–1974.

Chen, V. P., Gao, Y., Geng, L., & Brimijoin, S. (2017). Butyrylcholinesterase regulates central ghrelin signaling and has an impact on food intake and glucose homeostasis. *International journal of obesity* (2005), 41(9), 1413–1419.

Coussen, F., Ayon, A., Le Goff, A., Leroy, J., Massoulié, J., & Bon, S. (2001). Addition of a Glycophosphatidylinositol to Acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 27881–27892.



Duchnowicz, P., Ziobro, A., Rapacka, E., Koter-Michalak, M., & Bukowska, B. (2018). Changes in Cholinesterase Activity in Blood of Adolescent with Metabolic Syndrome after Supplementation with Extract from *Aronia melanocarpa*. *BioMed research international*, 2018, 5670145.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2016). Base de datos y documentación 2016, México, <http://ensanut.insp.mx/>.

Franco, R., & Vargas, M. R. (2018). Redox Biology in Neurological Function, Dysfunction, and Aging. *Antioxidants & redox signaling*, 28(18), 1583–1586.

Fricker, R. A., Green, E. L., Jenkins, S. I., & Griffin, S. M. (2018). The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System. *International journal of tryptophan research : IJTR*, 11, 1178646918776658.

Gabriel, A. J., Almeida, M. R., Ribeiro, M. H., Carneiro, D., Valério, D., Pinheiro, A. C., ... Baldeiras, I. (2018). Influence of Butyrylcholinesterase in Progression of Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(3), 1097–1105.

García P. P. y López G. (2007). Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutrición Hospitalaria*, 22, 5-13.

Gasperi, V., Sibilano, M., Savini, I., & Catani, M. V. (2019). Niacin in the Central Nervous System: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 974.

Gómez, J. L., García-Ayllón, M. S., Campoy, F. J., & Vidal, C. J. (2000). Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of *Lama2<sup>dy</sup>* mice. *Journal of Neuroscience Research*, 62(1), 134–145.

Goossens G. H. (2017). The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity facts*, 10(3), 207–215.

Graham A. J., Ray M. A., Perry E. K., Jaros E., Perry R. H., Volsen S. G., Bose S., Evans N., Lindstrom J. & Court, J. A. (2003). Differential nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the human hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 25(2), 97–113.

Guillemot-Legrís, O., & Muccioli, G. G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends in Neurosciences*, 40(4), 237–253.

Herman, A. P., Skipor, J., Krawczyńska, A., Bochenek, J., Wojtulewicz, K., Antushevich, H., ... Tomaszewska-Zaremba, D. (2017). Peripheral Inhibitor of AChE, Neostigmine, Prevents the Inflammatory Dependent Suppression of GnRH/LH Secretion during the Follicular Phase of the Estrous Cycle. *BioMed research international*, 2017, 6823209.

Huang, L. O., Loos, R. J. F., & Kilpeläinen, T. O. (2018). Evidence of genetic predisposition for metabolically healthy obesity and metabolically obese normal weight. *Physiological Genomics*, 50(3), 169–178.

Jiménez J. F. J., Navarro H. A., Peralta L. A. y Wadih T. J. (2006). Estrés oxidativo y enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología*; 42 (7): 419-427.

Jung, C. H., Lee, W. J., & Song, K.-H. (2017). Metabolically healthy obesity: a friend or foe? *The Korean Journal of Internal Medicine*, 32(4), 611–621. doi:10.3904/kjim.2016.259.

Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., & Soreq, H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393(6683), 373–377.

Kirkland J. B., Zempleni J., Suttie J. W., Gregory J. F., Stover P. J., editors (2013). *Handbook of Vitamins*. 5th ed. CRC Press; Boca Raton, FL, USA: pp. 149–190.

Lane, R. M., Potkin, S. G., & Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9(01), 101.

Lehner, C., Gehwolf, R., Tempfer, H., Krizbai, I., Hennig, B., Bauer, H. C., & Bauer, H. (2011). Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. *Antioxidants & redox signaling*, 15(5), 1305–1323.

Lin, C. I., Shen, C. F., Hsu, T. H., & Lin, S. H. (2017). A High-Fructose-High-Coconut Oil Diet Induces Dysregulating Expressions of Hippocampal Leptin and Stearoyl-CoA Desaturase, and Spatial Memory Deficits in Rats. *Nutrients*, 9(6), 619.

Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013, 321213.

Liu Y., Yu J., Shi Y. C., Zhang Y., & Lin S. 2019. The role of inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity-related cognitive impairment. *Life Science*; 233: 116707.

López-D. R. M., Valencia-Q. R., Sánchez-A. J., Pérez-A. B., Salinas-A. N., Serrano, H.,.....Gómez-O. J. L. (2018). La estructura y función de las colinesterasas: blanco de los plaguicidas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34, 69-80.

Macdonald, I. R., Maxwell, S. P., Reid, G. A., Cash, M. K., DeBay, D. R., & Darvesh, S. (2017). Quantification of Butyrylcholinesterase Activity as a Sensitive and Specific Biomarker of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 58(2), 491–505.

Maldonado-Ruiz, R., Fuentes-Mera, L., & Camacho, A. (2017). Central Modulation of Neuroinflammation by Neuropeptides and Energy-Sensing Hormones during Obesity. *BioMed research international*, 2017, 7949582.

Manchanda, S., & Kaur, G. (2017). *Withania somnifera* leaf alleviates cognitive dysfunction by enhancing hippocampal plasticity in high fat diet induced obesity model. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 136.

Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., ... Arrigo, T. (2014). Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 378–400.

Massoulié, J. (2002). The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases. *Neurosignals*, 11(3), 130–143.

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F.-M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31–91.

Mejía, S. Á., Gutman, L. A. B., Camarillo, C. O., Navarro, R. M., Becerra, M. C. S., Santana, L. D., ... Flores, M. D. (2018). Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP + and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress. *European Journal of Pharmacology*, 818, 499–507.

Mellendijk, L., Wiesmann, M., & Kiliaan, A. J. (2015). Impact of Nutrition on Cerebral Circulation and Cognition in the Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 7(11), 9416–9439.

Meshorer, E. (2002). Alternative Splicing and Neuritic mRNA Translocation Under Long-Term Neuronal Hypersensitivity. *Science*, 295(5554), 508–512.

Nagai, Y., Watanabe, Y., & Takatsu, K. (2013). The TLR family protein RP105/MD-1 complex: A new player in obesity and adipose tissue inflammation. *Adipocyte*, 2(2), 61–66.

Neha, Kumar, A., Jaggi, A. S., Sodhi, R. K., & Singh, N. (2014). Silymarin ameliorates memory deficits and neuropathological changes in mouse model of high-fat-diet-

induced experimental dementia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(8), 777–787.

Neuschwander-Tetri, B. A. (2013). Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 16(4), 446–452.

OMS. *Obesidad y sobrepeso*. <https://www.who.int/www.who.int>. 2016.

Pallebage-Gamarallage, M., Lam, V., Takechi, R., Galloway, S., Clark, K., & Mamo, J. (2012). Restoration of dietary-fat induced blood-brain barrier dysfunction by anti-inflammatory lipid-modulating agents. *Lipids in health and disease*, 11, 117.

Park, J., Choe, S. S., Choi, A. H., Kim, K. H., Yoon, M. J., Suganami, T., ... Kim, J. B. (2006). Increase in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Adipocytes Stimulates Oxidative Stress and Inflammatory Signals. *Diabetes*, 55(11), 2939–2949.

Pugazhenti, S., Qin, L., & Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(5), 1037–1045.

Rakonczay, Z. (2003). Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica*, 54(2), 183–189.

Ramli, N. S., Ismail, P., & Rahmat, A. (2016). Red pitaya juice supplementation ameliorates energy balance homeostasis by modulating obesity-related genes in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 243.

Rao, A. A., Sridhar, G. R., & Das, U. N. (2007). Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 69(6), 1272–1276.

Reichelt, A. C., Gibson G.D., Abbott, K.N. & Hare DJ. (2019). A high-fat high-sugar diet in adolescent rats impairs social memory and alters chemical markers characteristic of atypical neuroplasticity and parvalbumin interneuron depletion in the medial prefrontal cortex. *Food and function*, 10(4), 1985-1998.

Rhea, E. M., Salameh, T. S., Logsdon, A. F., Hanson, A. J., Erickson, M. A. & Banks W. A. (2017). Blood-Brain Barriers in Obesity. *The AAPS journal*; 19(4): 921–930.

Rogero, M. M., & Calder, P. C. (2018). Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, 10(4), 432.

Rojas-Gutierrez, E., Muñoz-Arenas, G., Treviño, S., Espinosa, B., Chavez, R., Rojas, K., ... Guevara, J. (2017). Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration. *Synapse*, 71(10), e21990.

Rotundo R. L. (2017). Biogenesis, assembly and trafficking of acetylcholinesterase. *Journal of neurochemistry*, 142 Suppl 2(Suppl 2), 52–58.

Sánchez, C. G. & Salceda, R. (2008). Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. *REB*, 27(2): 44-51

Shalev, D., & Arbuckle, M. R. (2017). Metabolism and Memory: Obesity, Diabetes, and Dementia. *Biological psychiatry*, 82(11), e81–e83.

Sodhi, R. K., & Singh, N. (2013). Defensive effect of lansoprazole in dementia of AD type in mice exposed to streptozotocin and cholesterol enriched diet. *PLoS one*, 8(7), e70487.

Song, S. B., Jang, S. Y., Kang, H. T., Wei, B., Jeoun, U. W., Yoon, G. S., & Hwang, E. S. (2017). Modulation of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Generation by Nicotinamide in a Manner Independent of SIRT1 and Mitophagy. *Molecules and cells*, 40(7), 503–514.

Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294–302.

Spector, R. (1979). Niacin and niacinamide transport in the central nervous system. In vivo studies. *Journal of Neurochemistry*; 33(4): 895–904.

Spector R. & Johanson C. E. (2007). Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. *Journal Neurochemistry*, 103 (2), 425-38.

Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 42.

Strømmland, Ø., Niere, M., Nikiforov, A. A., VanLinden, M. R., Heiland, I., & Ziegler, M. (2019). Keeping the balance in NAD metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 28, 47(1), 119-130.



Thaler, J. P., Yi, C. X., Schur, E. A., Guyenet, S. J., Hwang, B. H., Dietrich, M. O., ... Schwartz, M. W. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 153–162.

Thompson, J., Manore, M. M. and Vaughan, L. A. (2008). *Nutrición*. Pearson Educación, Madrid (España), 326-328.

Tófolo, L. P., Rinaldi, W., Gôngora, A. B., Matusso, C., Pavanello, A., Malta, A., ... Palma-Rigo, K. (2019). Moderate Physical Training Ameliorates Cardiovascular Dysfunction Induced by High Fat Diet After Cessation of Training in Adult Rats. *Frontiers in physiology*, 10, 170.

Verdin, E. (2015). NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*, 350, 1208-1213.

Waise, T. M. Z., Toshinai, K., Naznin, F., NamKoong, C., Md Moin, A. S., Sakoda, H., & Nakazato, M. (2015). One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(4), 1157–1162.

Wang, X., Chang, X., Zhu, Y., Wang, H., & Sun, K. (2016). Metabolically Obese Individuals of Normal Weight Have a High Risk of 25-Hydroxyvitamin D Deficiency. *The American Journal of the Medical Sciences*, 352(4), 360–367.

Weiss R., Schilling E., Grahnert A., Kölling V., Dorow J., Ceglarek U., Sack U. & Hauschildt S. (2015). Nicotinamide: a vitamin able to shift macrophage differentiation

toward macrophages with restricted inflammatory features. *Innate Immunity*, 21(8), 813–826002E.

Wernstedt, Asterholm, I., Tao, C., Morley, T. S., Wang, Q. A., Delgado-Lopez, F., Wang, Z. V., & Scherer, P. E. (2014). Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell metabolism*, 20(1), 103–118.

Yamaguchi, S., & Yoshino, J. (2017). Adipose tissue NAD<sup>+</sup> biology in obesity and insulin resistance: From mechanism to therapy. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 39(5), 10.1002/bies.201600227.

Yu, J., Peng, J., Luan, Z., Zheng, F., & Su, W. (2019). MicroRNAs as a Novel Tool in the Diagnosis of Liver Lipid Dysregulation and Fatty Liver Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(2), 230.

Zheng, X., Deng, J., Zhang, T., Yao, J., Zheng, F., & Zhan, C. G. (2016). Potential anti-obesity effects of a long-acting cocaine hydrolase. *Chemico-biological interactions*, 259(Pt B), 99–103.