
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Efecto del extracto de matarique en la memoria y aprendizaje en un modelo de ratón con resistencia a la insulina inducida por dieta

QUE PRESENTA EL ALUMNO

Edher Martín Navarrete Jiménez

Matrícula: 2112036194

ASESORES:

M en C. María del Consuelo Velázquez Alva
Profesora Investigadora Titular "C"
Departamento de Atención a la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Dra. Isabel Arrieta Cruz
Investigadora en Ciencias Médicas "D"
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriátría

RESUMEN

Estudios epidemiológicos han mostrado que la presencia de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) podría duplicar el riesgo de desarrollar demencia en personas adultas mayores. Por esta razón nuevas sustancias con efecto hipoglucemiante se han convertido en blancos potencialmente terapéuticos para el manejo farmacológico de personas con demencia, principalmente aquellas afectadas por la Enfermedad de Alzheimer (EA). Por lo que la presente propuesta pretende evaluar los efectos hipoglucemiantes del extracto de matarique en un modelo de ratón agravado por la resistencia a la insulina inducida por dieta. Para la fase experimental se obtuvieron extractos de la planta *Psacalium decompositum* a través de cromatografía de capa fina y se identificó el compuesto por métodos espectrométricos y espectroscópicos. Posteriormente se realizaron ensayos biológicos en animales de experimentación, los cuales fueron tratados con dieta alta en grasa y se les administró de manera crónica extracto de matarique. Al término de los tratamientos se evaluó la memoria y aprendizaje utilizando la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (memoria no espacial) y la prueba del laberinto acuático de Morris (memoria espacial). Los resultados revelaron que con la fracción F1 (fracción hexánica) a una dosis de 160 mg/kg se obtuvieron los mejores resultados en ambas pruebas conductuales. Esto puede explicarse debido a que estudios previos reportan que la fracción hexánica es la que mayor concentración de cacalol posee (Aларcon-Aguilar FJ., *et al.*, 2000) lo que puede generar efectos positivos en el deterioro cognitivo por su efecto hipoglucemiante y además beneficiar algunas funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje. Sin embargo, se llevarán a cabo más estudios sobre ensayos conductuales y de biología molecular, con la finalidad de ampliar la información sobre los efectos hipoglucemiantes del cacalol en áreas del cerebro relacionadas con memoria y aprendizaje.

Palabras clave: *Psacalium decompositum*, Cacalol, Diabetes, Enfermedad de Alzheimer

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
Diabetes y su asociación con la Enfermedad de Alzheimer	4
Participación de la insulina en la Enfermedad de Alzheimer	5
Modelos preclínicos de la Enfermedad de Alzheimer	7
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
METODOLOGÍA	14
1. Aislar y extraer las fracciones enriquecidas y del compuesto puro de cacalol de la planta <i>Psacalium decompositum</i>	14
2. Evaluar los efectos del tratamiento a largo plazo del cacalol sobre la memoria y el aprendizaje en un modelo de ratón	15
3. Evaluar el efecto hipoglucemiante a largo plazo del cacalol sobre la memoria y aprendizaje en animales con resistencia a la insulina inducida por dieta	17
Análisis estadístico	18
Aspectos éticos y de bioseguridad	19
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS	25

INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos han mostrado que la presencia de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) podría duplicar el riesgo de desarrollar demencia en personas adultas mayores. Por esta razón nuevas sustancias con efecto hipoglucemiante se han convertido en blancos potencialmente terapéuticos para el manejo farmacológico de personas con demencia, principalmente aquellas afectadas por la Enfermedad de Alzheimer (EA). Por otro lado, existe evidencia científica sobre los efectos hipoglucemiantes del cacalol, un sesquiterpeno encontrado en el extracto de la planta matarique, en modelos animales con DM2. A la fecha no se conoce que se hayan probado los efectos benéficos del matarique en la memoria y aprendizaje. Por lo que se pretende evaluar los efectos hipoglucemiantes del matarique sobre la memoria y aprendizaje en un modelo de ratón con resistencia a la insulina inducida por dieta. La Diabetes Mellitus (DM) es el principal problema de salud pública en México afectando no sólo a la población general adulta si no también a la población infantil, siendo la DM la primera causa de muerte en los adultos dentro del grupo de edad de 50 a los 60 años de acuerdo con el último censo sanitario publicado por la Secretaria de Salud en México en el 2012. Se estima que el crecimiento en la incidencia de la DM en México crecerá más del 40% en los próximos años, produciendo la muerte de más de 100 mil mexicanos por año. Actualmente en México hay más de 10 millones de personas enfermas con DM (tipo 1 y 2) ejerciendo un impacto económico enorme para el manejo y tratamiento de esta patología y sus complicaciones en los servicios médicos de salud pública en México (Ensanut, 2012). La DM2 se caracteriza predominantemente por hiperglucemia y resistencia a la insulina (RI) y es el trastorno metabólico más común en los ancianos. Amplia evidencia científica ha propuesto a la RI como un factor de riesgo para acelerar el deterioro cognitivo y conductual en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Leibson Cl., *et al.*, 1997; Ohara T., *et al.*, 2011; Ott A., *et al.*, 1999; Peila R., *et al.*, 2002). La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo y es la causa más común de demencia en los ancianos afectando a más de 30 millones de personas en todo el mundo, afectando aproximadamente a un 10 % de adultos mayores de 65 años y un 47 % en personas mayores de 85 años, aunque también puede presentarse en personas jóvenes entre los 35 y los 50 años de edad. En México se estima que más de 800 mil personas están afectadas por la EA y se pronostica que su incidencia se incrementará significativamente en México en las próximas décadas hasta alcanzar la cifra alarmante de

3.5 millones de mexicanos afectados para el año 2050 (Gutiérrez-Robledo y Arrieta Cruz., 2014). Los mecanismos por los cuales la DM2 impacta en el desarrollo de la EA aún no han sido totalmente esclarecidos. Algunos de los factores de riesgo que han sido propuestos en la aceleración del proceso neurodegenerativo y la progresión de la demencia en la EA y que son signos característicos de la DM2 son: la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo, la activación de citocinas inflamatorias y el daño al sistema micro/macrovascular (Whitmer RA., 2007; Whitmer RA., *et al.*, 2008). Algunos hallazgos relevantes de estudios clínicos en pacientes con la EA han detectado altas concentraciones de insulina en plasma durante el ayuno y bajas concentraciones de insulina en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con la EA comparando estos niveles con individuos sanos (Craft S., *et al.*, 1998; Frölich L., *et al.*, 1998). La evidencia de que individuos diagnosticados con la EA presentan alteraciones en la regulación sistémica de la insulina y progresión de la demencia sugiere que la insulina está involucrada en la regulación de las funciones cognitivas y que podría tener un papel relevante en la fisiopatología de la EA.

A la fecha no existe un tratamiento farmacológico o no farmacológico efectivo para el manejo terapéutico de la EA y mucho menos una terapia que retrase exitosamente su progresión o su cura. Sin embargo, existe amplia evidencia en la literatura sobre la eficacia de algunos novedosos tratamientos en modelos animales de la EA, entre los que se destaca a compuestos como polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados, vitamina D y antioxidantes que han retrasado la aparición del deterioro de la memoria y aprendizaje, así como una disminución en la acumulación anormal de los péptidos beta-amiloides en roedores afectados por la EA (Annweiler C., *et al.*, 2015; Silva T., *et al.*, 2014). Estudios recientes en humanos han demostrado que el consumo crónico de ciertos hipoglucemiantes orales mejora las funciones cognitivas en pacientes afectados por demencia de tipo EA. Los estudios con hipoglucemiantes orales se han enfocado principalmente en evaluar los efectos a nivel de sistema nervioso central de la metformina y las tiazolidinas (Imfeld P., *et al.*, 2012; Moreira RO., *et al.*, 2013). Se ha observado que estos fármacos afectan el metabolismo energético, procesos inflamatorios y promueven la regeneración en tejido cerebral; por todo esto se ha considerado a estos fármacos como terapias nuevas modificadoras de enfermedades neurodegenerativas en pacientes con o sin diabetes. Nuevas sustancias anti-diabetogénicas o con efecto hipoglucemiante se han convertido en blancos potencialmente terapéuticos para

mejorar las alteraciones de la memoria y el aprendizaje presentes en personas afectadas por demencia principalmente de tipo EA. En la región norte de México se consume con frecuencia una infusión de raíces procedentes de una planta conocida coloquialmente con el nombre de “Matarique”, a la cual se le ha atribuido entre otras propiedades efectos anti-diabetogénicos. El nombre científico de la planta es *Psacalium decompositum*, cuyo constituyente principal son los sesquiterpenos, como el cacalol, el cacalone y las maturinas (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 1997). Estudios in vivo han demostrado que la administración de extractos de *Psacalium decompositum* disminuyen los niveles plasmáticos de glucosa en ratones sanos durante el ayuno e induce una disminución de la glucosa sanguínea en conejos hiperglucémicos. También se ha demostrado la actividad hipoglucemiante de estos extractos en ratones diabéticos (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 2000). Fracciones purificadas de los extractos de *Psacalium decompositum* cuya composición principal es el sesquiterpeno, cacalol, han mostrado mejores efectos hipoglucémicos y el mecanismo posible propuesto para llevar a cabo este efecto se debe al bloqueo de los canales de potasio sensibles a ATP (Campos MG., *et al.*, 2009). Estos efectos de las fracciones ricas en cacalol fueron comparadas con la glibenclamida, una sulfonilurea, uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la DM2. Además, se ha probado el efecto antioxidante potencial del cacalol a través de la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (Jiménez-Estrada M., *et al.*, 2008). Por lo que la presente propuesta pretende demostrar los efectos benéficos de un sesquiterpeno, como es el cacalol, sobre la memoria y aprendizaje en un modelo de ratón normal agravado por resistencia a la insulina inducida por dieta.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Diabetes y su asociación con la Enfermedad de Alzheimer

La Diabetes Mellitus (DM) es el principal problema de salud pública en México afectando no sólo a la población general adulta sino también a la población infantil, siendo la DM la primera causa de muerte en los adultos dentro del grupo de edad de 50 a los 60 años de acuerdo con el último censo sanitario publicado por la Secretaria de Salud en México en el 2012. Se estima que el crecimiento en la incidencia de la DM en México crecerá más del 40% en los próximos años, produciendo la muerte de más de 100 mil mexicanos por año. Actualmente en México hay más de 10 millones de personas enfermas con DM (tipo 1 y 2) ejerciendo un impacto económico enorme para el manejo y tratamiento de esta patología y sus complicaciones en los servicios médicos de salud pública en México (Ensanut, 2012).

La DM2 se caracteriza predominantemente por hiperglucemia y resistencia a la insulina (RI) y es el trastorno metabólico más común en los ancianos. Amplia evidencia científica ha propuesto a la RI como un factor de riesgo para acelerar el deterioro cognitivo y conductual en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Leibson Cl., *et al.*, 1997; Ohara T., *et al.*, 2011; Ott A., *et al.*, 1999; Peila R., *et al.*, 2002). La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo y es la causa más común de demencia en los ancianos afectando a más de 30 millones de personas en todo el mundo, afectando aproximadamente a un 10 % de adultos mayores de 65 años y un 47 % en personas mayores de 85 años, aunque también puede presentarse en personas jóvenes entre los 35 y los 50 años. En México se estima que más de 800 mil personas están afectadas por la EA y se pronostica que su incidencia se incrementará significativamente en México en las próximas décadas hasta alcanzar la cifra alarmante de 3.5 millones de mexicanos afectados para el año 2050 (Gutiérrez-Robledo y Arrieta Cruz., 2014).

Los mecanismos por los cuales la DM2 impacta en el desarrollo de la EA aún no han sido totalmente esclarecidos. Algunos de los factores de riesgo que han sido propuestos en la aceleración del proceso neurodegenerativo y la progresión de la demencia en la EA y que son signos característicos de la DM2 son: la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo, la activación de citocinas inflamatorias y el daño al sistema micro/macrovacular (Whitmer RA., 2007; Whitmer RA., *et al.*, 2008). Algunos hallazgos relevantes de estudios

clínicos en pacientes con la EA han detectado altas concentraciones de insulina en plasma durante el ayuno y bajas concentraciones de insulina en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con la EA comparando estos niveles con individuos sanos (Craft S., *et al.*, 1998; Frölich L., *et al.*, 1998). La evidencia de que individuos diagnosticados con la EA presentan alteraciones en la regulación sistémica de la insulina y progresión de la demencia sugiere que la insulina está involucrada en la regulación de las funciones cognitivas y que podría tener un papel relevante en la fisiopatología de la EA.

Participación de la insulina en la Enfermedad de Alzheimer

La presencia de la insulina y de su receptor en el Sistema Nervioso Central (SNC) sugiere que el cerebro es un órgano blanco para la acción de la insulina ejerciendo múltiples funciones, destacando sus acciones neurotróficas, neuromoduladoras y neuroendocrinas. La insulina llega al SNC a través de la barrera hemato-encefálica o por producción local en el cerebro (Schulinkamp RJ., *et al.*, 2000). El receptor a insulina se ha detectado en altas concentraciones en diversas áreas del cerebro tales como el bulbo olfatorio, el hipotálamo, la hipófisis, el hipocampo y la corteza en cerebros de roedores y de humano (Unger JW., *et al.*, 1991; Schulinkamp RJ., *et al.*, 2000). Algunas de las funciones del receptor a insulina sobre la regulación de la ingesta de alimento, el metabolismo energético y la reproducción en el SNC han sido estudiadas en modelos de ratones mutantes que no expresan este receptor en el cerebro, por lo que estos animales presentan un fenotipo característico: incremento en la ingesta de alimento, obesidad inducida por dieta, aumento de la grasa corporal, incremento de las concentraciones plasmáticas de leptina, insulina y triglicéridos, leve RI y alteraciones en funciones reproductivas (Brüning JC., *et al.*, 2000; Burks DJ., *et al.*, 2000). Por otro lado, existe mucha evidencia del papel potencial del receptor a insulina en modular la actividad sináptica en el SNC a través de su participación en la regulación de la liberación y la recaptura de neurotransmisores (Abbott MA., *et al.*, 1999; Christie JM., *et al.*, 1999; Lin JW., *et al.*, 2000; Wan Q., *et al.*, 1997). La abundancia del receptor a insulina en el hipocampo y la corteza cerebral es importante para funciones cognitivas (Park CR., 2001; Zhao WQ., y Alkon DL., 2001). Se ha observado un déficit en el metabolismo energético y en la memoria y aprendizaje en ratas que han sido tratadas con estreptozotocina (una toxina diabetogénica) por vía intracerebroventricular (Lannert H., y Hoyer S., 1998). Los

mecanismos moleculares por los cuales la insulina afecta las funciones cognitivas han sido explorados a través de estudios en las vías de señalización de la insulina en la EA. Se ha reportado que la expresión del receptor a insulina esta incrementada en cerebros de pacientes que fueron diagnosticados con la EA, mientras que su actividad de tirosina cinasa se encuentra reducida sugiriendo defectos en la señalización de la insulina en la EA (Frölich L., et al., 1998). Nuevos reportes han indicado que la insulina regula el metabolismo de las proteínas beta-amilode (β A) y tau, componentes principales de las placas seniles y las marañas neurofibrilares respectivamente y que conforman las lesiones neuropatológicas características en la EA. La unión de la proteína tau a los microtúbulos está regulada a través de su fosforilación por proteínas cinasas, incluyendo la proteína cinasa glucógeno sintetasa 3 beta (GSK-3 β). La GSK-3 β es un componente principal en la cascada de señalización de la insulina y su actividad está regulada por la presencia de la insulina o por el factor de crecimiento asociado a la insulina 1 (IGF-1) (Schulingkamp R.J., et al., 2000; Siddle K., et al., 2001). Estudios en cultivos neuronales han demostrado que la insulina y la IGF-1 reducen la fosforilación de tau y promueve la unión de tau a los microtúbulos por la inhibición de la GSK-3 β a través de la vía de la fosfoinositol-3 cinasa (Hong M., y Lee V.M., 1997), también ha sido reportado que la insulina y la IGF-1 incrementan transitoriamente la fosforilación de tau en residuos específicos a través de la activación de la GSK-3 β por la vía de la tirosina cinasa Fyn (Lesort M., y Johnson G.V., 2000). Estudios han propuesto que la insulina pudiera promover la acumulación de la β A por la aceleración en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide por activación de la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Gasparini., et al., 2001). Otras líneas de investigación han propuesto la participación de la enzima degradante de insulina (IDE) como parte de la cascada molecular involucrada en promover la acumulación anormal de la β A en el cerebro de personas afectadas con la EA. La IDE es una metaloproteinasas que degrada a la insulina así como ciertos péptidos pequeños, incluyendo al β A, se ha hipotetizado que la unión de la insulina con la IDE reduce la degradación y eliminación del β A bajo condiciones de hiperinsulinemia y promueve la formación de las placas de amiloide (Qiu W.Q., y Folstein M.F., 2006; Selkoe D.J., 2001). El papel de la IDE en la degradación de los β A en modelos de roedores *in vivo* ha sido muy debatida y cuestionada, debido a que nueva evidencia indica que otra metaloproteinasas neuronal como la neprilisina, no es inhibida por la insulina y que

la IDE podría no estar involucrada directamente en la degradación de la β A en modelos *in vivo* (Iwata N., *et al.*, 2000 y 2001).

Modelos preclínicos de la Enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo y es la causa más común de demencia en las personas de edad avanzada. La EA está caracterizada por una pérdida progresiva de las habilidades cognitivas incluyendo el déficit en la memoria. En el análisis neuropatológico de la EA se muestra una atrofia extensiva cortical causada por una pérdida neuronal severa y dentro de los hallazgos celulares característicos de esta enfermedad se incluye a las marañas neurofibrilares y las placas seniles (neuríticas) rodeadas de áreas extensas de inflamación (astrogliosis y activación de la microglía) en regiones específicas del SNC, entre los que destacan la corteza y el hipocampo (Selkoe DJ., 2001). El componente principal de las marañas neurofibrilares son los filamentos helicoidales constituidos por formas hiperfosforiladas de la proteína del citoesqueleto llamada tau, mientras que las placas seniles consisten en depósitos anormales de β A de diversos tamaños, predominantemente β A₁₋₄₀ o β A₁₋₄₂, constituidos por 40 o 42 aminoácidos respectivamente, rodeadas por neuritas distróficas. Los β A son derivados de la escisión proteolítica de la proteína precursora de β -amiloide por acción de la β - y la γ -secretasa, llamada vía amiloidogénica. La acción de la α y γ -secretasa sobre la proteína precursora de β -amiloide previene la formación de los β A y es llamada la vía no-amiloidogénica (LaFerla FM., *et al.*, 2007; Mi K., y Johnson GV., 2006; Shoji M., *et al.*, 1992).

Extensa evidencia científica ha demostrado el efecto neurotóxico de los β A sobre la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* para estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la fisiopatología de la EA. Por ejemplo, una sobreproducción de β A en las dendritas o axones reduce el número y la plasticidad de las sinapsis (Shankar GM., *et al.*, 2007; Wei W., *et al.*, 2010). Se ha observado en modelos de ratones transgénicos de la EA una disminución significativa de la densidad en las espinas dendríticas, así como severas alteraciones en la neurotransmisión afectando la plasticidad neuronal (Jacobsen JS., *et al.*, 2006; Moolman DL., *et al.*, 2004). Estas anomalías en las espinas dendríticas tienen una correlación clínica con los síntomas observados en pacientes con la EA (Tsai J., *et al.*, 2004). Los efectos neurotóxicos de los β A

son más agresivos y dañinos cuando es causado por oligómeros solubles del β A, los cuales bloquean la potenciación sináptica a largo plazo induciendo un daño severo en la plasticidad sináptica con la consecuente alteración en la memoria y el aprendizaje (Shankar GM., *et al.*, 2008; Shankar GM., y Walsh DM., 2009). La acumulación de depósitos anormales fibrilares de amiloide o de sus formas solubles causa alteraciones sinápticas permanentes en el hipocampo y la corteza cerebral con un fuerte impacto en la patogénesis y la progresión de la EA.

Los modelos experimentales *in vivo* en los roedores son los más utilizados para entender mejor los mecanismos neurotóxicos de los β A en el SNC y su papel esencial en la neurodegeneración que genera la demencia en la EA (Hardy JA., y Higgins GA., 1992; Selkoe DJ., 1991). Estudios realizados con infusiones crónicas de β A en los ventrículos cerebrales de ratas mostraron un patrón de degeneración y muerte neuronal extensa en el cerebro (Nitta A., *et al.*, 1997); daño en la transmisión y la plasticidad sináptica del hipocampo (Itoh A., *et al.*, 1999), y déficit en los niveles de neurotransmisores como la acetilcolina, la dopamina y otros neuropéptidos (Itoh A., *et al.*, 1996; Nag S., *et al.*, 1999) estas observaciones refleja lo encontrado en cerebros de pacientes con la EA. Estudios extensos han sido publicados para demostrar alteraciones conductuales por la administración del β A en el hipocampo, como por ejemplo ha sido observado un déficit conductual severo en los paradigmas de memoria espacial en roedores que han sido tratados con el β A (Chen SY., *et al.*, 1996; O'Hare E., *et al.*, 1999; Sweeney WA., *et al.*, 1997). Estas manipulaciones farmacológicas con el β A han sido de utilidad para estudiar sus efectos en la memoria y el aprendizaje y han sido implementadas para mimetizar en parte la disfunción cognitiva observada en los pacientes con la EA.

Uno de los modelos de ratón transgénico más nuevos desarrollados para entender la complejidad de la EA es un modelo de ratón triple transgénico (3xTg-AD), es el único modelo animal hasta el momento en el que se puede encontrar alterado al mismo tiempo el metabolismo de tres proteínas involucradas en la fisiopatología de la EA y son: β A, Tau y presinilinas. El fenotipo del 3xTg-AD está restringido a alteraciones en el SNC, incluyendo al hipocampo y la corteza cerebral. Los ratones afectados muestran acumulación anormal progresiva de la β A a edades tan tempranas de tres a cuatro meses de edad. La formación de marañas neurofibrilares aparece a los 6 meses de edad en la corteza frontal llegando a ser

extensivas a los 12 meses de edad. Cambios en la hiperfosforilación de la proteína Tau ocurre tardíamente entre los 12 y 15 meses de edad. Asociándose estos cambios a disfunción sináptica y disminución en la plasticidad neuronal. También se ha observado alteraciones conductuales tempranas desde los 4 meses de edad e incrementándose el déficit en memoria y aprendizaje a los 12 meses de edad (Billings LM., *et al.*, 2005; Oddo S, *et al.*, 2003, Stover KR., *et al.*, 2015). Por lo que este modelo animal es una herramienta útil para continuar estudiando los mecanismos celulares y moleculares que inducen el proceso de muerte neuronal observada en la EA.

Justificación

A la fecha no existe un tratamiento farmacológico o no farmacológico efectivo para el manejo terapéutico de la EA y mucho menos una terapia que retrase exitosamente su progresión o su cura. Sin embargo, existe amplia evidencia en la literatura sobre la eficacia de algunos novedosos tratamientos en modelos animales de la EA, entre los que se destaca a compuestos como polifenoles, ácidos grasos poli-insaturados, vitamina D y antioxidantes que han retrasado la aparición del deterioro de la memoria y aprendizaje, así como una disminución en la acumulación anormal del β A en roedores afectados por la EA (Annweiler C., *et al.*, 2015; Silva T., *et al.*, 2014). Estudios recientes en humanos han demostrado que el consumo crónico de ciertos hipoglucemiantes orales mejora las funciones cognitivas en pacientes afectados por demencia de tipo EA. Los estudios que han evaluado los efectos de hipoglucemiantes orales como la metformina y las tiazolidinas en el SNC se han enfocado principalmente en aspectos celulares y moleculares (Imfeld P., *et al.*, 2012; Moreira RO., *et al.*, 2013). Se ha observado que estos fármacos afectan el metabolismo energético, procesos inflamatorios y promueven la regeneración en tejido cerebral; por todo esto se ha considerado a estos fármacos como terapias nuevas modificadoras de enfermedades neurodegenerativas en pacientes con diabetes.

En la región norte de México se consume con frecuencia una infusión de raíces procedentes de una planta conocida coloquialmente con el nombre de “Matarique”, a la cual se le ha atribuido entre otras propiedades efectos anti-diabetogénicos. El nombre científico de la planta es *Psacalium decompositum*, cuyo constituyente principal son los sesquiterpenos, como el cacalol, el cacalona y las maturinas (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 1997). Estudios *in vivo* han demostrado que la administración de extractos de *Psacalium decompositum* disminuye los niveles plasmáticos de glucosa en ratones sanos durante el ayuno e induce una disminución de la glucosa sanguínea en conejos hiperglucémicos. También se ha demostrado la actividad hipoglucemiante de estos extractos en ratones diabéticos (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 2000). Fracciones purificadas de los extractos de *Psacalium decompositum* cuya composición principal es el sesquiterpeno, cacalol, han mostrado mejores efectos hipoglucémicos y el mecanismo posible propuesto para llevar a cabo este efecto se debe al bloqueo de los canales de potasio sensibles a ATP (Campos MG., *et al.*, 2009). Estos efectos

de las fracciones ricas en cacalol fueron comparadas con la glibenclamida, una sulfonilurea, uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la DM2. Además, se ha probado el efecto antioxidante potencial del cacalol a través de la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (Jiménez-Estrada M., *et al.*, 2008).

Nuevas sustancias anti-diabetogénicas o con efecto hipoglucemiante se han convertido en blancos potencialmente terapéuticos para mejorar las alteraciones de la memoria y el aprendizaje presentes en personas afectadas por demencia, principalmente de tipo EA. A la fecha no se conoce de ningún estudio en el que se hayan probado los efectos benéficos de algún sesquiterpeno en un modelo preclínico de la EA con implicaciones terapéuticas para la demencia agravada por DM2. Por lo que la presente propuesta pretende evaluar los efectos hipoglucemiantes de un sesquiterpeno, como es el cacalol, en un modelo de ratón agravado por resistencia a la insulina inducida por dieta.

Hipótesis

Si la presencia de un estado metabólico alterado como es la resistencia a la insulina donde se observa principalmente hiperglucemia e hiperinsulinemia, se encuentra altamente asociado a los procesos moleculares que aceleran la neurodegeneración en regiones específicas del cerebro involucrado en el control de la memoria y el aprendizaje que se ven afectadas en la EA. Entonces, el mantenimiento de la glucosa sistémica en niveles normales es indispensable para disminuir el riesgo de desarrollo de demencia, por lo que la terapia con cacalol, un sesquiterpeno, con actividad hipoglucemiante, anti-oxidante y anti-inflamatoria podría ayudar a disminuir el agravamiento en la memoria y el aprendizaje en un modelo de ratón que desarrolle resistencia a la insulina inducida por dieta rica en grasa.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los efectos anti-diabetogénicos del cacalol, un sesquiterpeno, para mejorar memoria y aprendizaje en un modelo de ratón agravado por resistencia a la insulina inducida por dieta rica en grasa.

Objetivos específicos:

1. Aislamiento y extracción de fracciones enriquecidas y del compuesto puro de cacalol de la planta *Psacalium decompositum*.
2. Evaluar los efectos del tratamiento a largo plazo del cacalol sobre la memoria y el aprendizaje en un modelo de ratón.
3. Evaluar el efecto hipoglucemiante a largo plazo del cacalol sobre la memoria y aprendizaje en animales con resistencia a la insulina inducida por dieta.

METODOLOGÍA

Para cumplir satisfactoriamente con los objetivos planteados en este estudio se procedió a utilizar la siguiente metodología:

1. Aislar y extraer las fracciones enriquecidas y del compuesto puro de cacalol de la planta *Psacalium decompositum*

La selección de la planta *Psacalium decompositum* se llevó a cabo por métodos macroscópicos y microscópicos establecidos en el laboratorio de productos naturales del Instituto de Química de la UNAM. La planta se obtendrá comercialmente a través de almacenes ya identificados, por el grupo científico, que venden productos naturales en el Estado de Chihuahua. La selección de la planta por métodos macroscópicos incluye las características de color, diámetro de raíces, olor, y textura. Para la selección por métodos microscópicos se procederá a cortar de la planta las partes subterráneas denominadas rizomas (raíces) debido a que en esta estructura se encuentra abundantemente las sustancias químicas de interés terapéutico. Para la extracción del compuesto (cacalol) de interés se realizaron extractos con solventes como hexano, cloruro de metileno, etanol, metanol y acuoso con los rizomas seleccionados. En el laboratorio de productos naturales del Instituto de Química ya se ha aislado, extraído e identificado con éxito el compuesto a estudiar en el presente proyecto, por lo que se cuenta con muestras que sirvieron como controles de referencia para la identificación de los principales compuestos sesquiterpénicos y asegurar que se está trabajando con la planta auténtica (para detalles consultar las tesis siguientes: Merino-Aguilar H., 2005 y Rojano-Vilchis NA., 2015). Cada fase de la extracción fue analizada por cromatografía por columna abierta, para la identificación de los principales compuestos sesquiterpénicos como son: el cacalol, la cacalona y las maturinas; estas fracciones obtenidas se analizaron después por cromatografía en capa fina y la identificación final del compuesto se realizó por estudios espectroscópicos utilizando resonancia magnética nuclear. Finalmente se utilizó difracción de rayos X para la determinación estereoquímica del compuesto y asegurar la identificación del compuesto en las diferentes fracciones obtenidas en las distintas fases de extracción. En el caso de la fracción de extracción con hexano posteriormente fue procesada con metanol y el exceso de agua se evaporó por alto vacío, obteniéndose un

precipitado y una fracción soluble en agua y otra en metanol. La fracción soluble en agua fue analizada por cromatografía de alta resolución de capa fina y se procedió a la fase de elución final para la obtención de fracciones enriquecidas con cacalol. Estas fracciones enriquecidas fueron 4 con diferentes concentraciones de compuestos sesquiterpénicos, 15%, 25%, 30% y 40% respectivamente. Una vez obtenidas las fracciones enriquecidas, se seleccionó la fracción con la más alta concentración de cacalol para proceder a la extracción del compuesto puro de cacalol para alcanzar una pureza del 90 al 95%. A las fracciones enriquecidas se les removió el metanol o etanol mediante el uso de un liofilizador para remover trazas de estos solventes para que solamente quede el extracto sólido que fué disuelto en un medio acuoso para la administración en los animales de experimentación.

2. Evaluar los efectos del tratamiento a largo plazo del cacalol sobre la memoria y el aprendizaje en un modelo de ratón

Animales de experimentación: Se utilizó ratones macho C57BL/6 de 2 meses de edad (N total= 30 animales, 5 animales por grupo experimental) Se trabajó solamente con ratones macho para evitar los efectos de las hormonas esteroides sexuales, específicamente de los estrógenos, a los que se encuentra expuesto el cerebro de los ratones hembra, debido a que los estrógenos tienen efectos a nivel neuroquímico, neuroendócrino y conductual en diversas regiones del cerebro (Frick KM y Berger-Sweeney J., 2001; Nelson JF., *et al.*, 1987; Van Goethem NP., *et al.*, 2012). Los animales fueron donados por la Dra. Hilda Martínez Coria, adscrita a la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM, quién es una experta en manejo y trabajo experimental de estos animales además de ser investigadora asociada en este estudio. Todo el manejo experimental con los animales propuestos en el presente protocolo se llevó a cabo en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza de la UNAM. Los animales fueron puestos en cuarentena siguiendo los principios señalados en el artículo 5.4.4 correspondiente a los cuidados de los animales de experimentación en cuarentena y período de adaptación de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Una vez terminado el período de cuarentena, los animales fueron transferidos al cuarto asignado para los procedimientos experimentales y mantenidos ahí hasta el momento de ser sacrificados. Todos los animales se alojaron en jaulas para ratón fabricadas en polisulfonato con las siguientes dimensiones: 18.4 cm ancho x 29.20 cm largo

x 12.7 cm altura, con rejilla de acero inoxidable con una depresión que hace las veces de comedero y porta-bebedero, además de contar la jaula con una tapa filtro de polisulfonato con papel filtro que permite la re-circulación del aire. Se alojó un máximo 4 ratones macho por jaula para evitar el hacinamiento y reducir el estrés territorial; además los animales tuvieron acceso libre a agua potable y comida. El ciclo luz/oscuridad fue de 12:12 h, con 15 cambios de aire por hora, una temperatura controlada entre 22 a 26°C y una humedad relativa promedio de 50%. Los animales fueron organizados en 6 grupos para ser tratados por vía enteral a través de sonda esófago-gástrica para la administración directa del tratamiento en el estómago, en un volumen de 20, 80 y 160 ml/kg de peso corporal. Los grupos fueron: 1) Fracción enriquecida 1 (F1); 2) F2; 3) F3, 4) F4; y 6) vehículo (solución salina 0.9% fisiológica). Las dosis que fueron utilizadas en el presente estudio ya han sido establecidas y evaluadas en previos reportes (Aларcon-Aguilar FJ., et al., 2000). El tiempo de administración de los tratamientos fue de cuatro semanas, una dosis diaria.

Pruebas conductuales: Inmediatamente después del período de tratamiento, se procedió a la evaluación de los efectos de las fracciones enriquecidas en los animales. Para la evaluación de la memoria y aprendizaje se utilizó la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (memoria no espacial) y la prueba del laberinto acuático de Morris (memoria espacial). La prueba de reconocimiento de objetos se realiza en un campo abierto (caja de acrílico color negra) con dimensiones específicas (30 cm de largo x 23 cm de ancho y 23 cm de altura) con objetos que deben ser de similar color, tamaño y textura, pero de distinta forma. La primera fase de habituación se coloca al animal en el campo abierto sin ningún objeto y se deja transcurrir un tiempo entre 10-30 minutos para que se familiarice con el entorno. 24 horas después se realiza la fase de entrenamiento, para lo cual se colocan dos objetos idénticos en distinta posición y se permite al animal explorar los objetos durante 5 o 10 minutos, en los que se contabiliza el tiempo que dedica el animal a explorar cada objeto, al terminar se remueve al animal de la caja de prueba y se regresa a su caja de mantenimiento. En la fase de prueba, se deja un objeto familiar y se coloca un objeto nuevo, la memoria a corto plazo se evalúa una hora después de la fase de entrenamiento, registrando el tiempo de exploración que dedica el animal a los objetos familiar y nuevo. La memoria a largo plazo se evalúa 24 horas después de la fase de entrenamiento. Entre cada animal, la caja de acrílico es limpiada con etanol a 70% y secada completamente para evitar contaminación por olores o restos de

excremento de los ratones estudiados.

La prueba del laberinto acuático de Morris se lleva a cabo en una piscina circular (diámetro de 120 cm) dividida en cuatro cuadrantes imaginarios (designados como noroeste, suroeste, noreste y sureste) la cual es llenada con agua a una temperatura entre 22 y 25°C; la piscina tiene una plataforma de escape oculta y parcialmente sumergida, la cual se encuentra a 0.5 cm por debajo del agua. Alrededor de la piscina se colocan señales visuales para facilitar la orientación espacial del animal. En la fase de adquisición se coloca al animal en la piscina para que busque la plataforma de escape oculta durante 60 o 120 segundos. Después se retira el animal de la plataforma y se le deja descansar cuatro minutos antes de iniciar el siguiente ensayo. En la fase de adquisición o aprendizaje se repite la prueba por 5 días consecutivos. En la última fase de retención se coloca al animal en la piscina sin la plataforma y se registra el tiempo que pasa en el cuadrante donde estaba. Se mide la latencia de escape (tiempo que transcurre hasta que el animal alcanza la plataforma) en la fase de adquisición. La adquisición se refleja en las menores latencias de escape a lo largo de los días y el mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante donde se encuentra la plataforma de escape.

Ensayos de toxicidad: Después de concluir con los ensayos conductuales, los animales fueron sacrificados por sobre-dosis de pentobarbital sódico administrado intraperitonealmente a una dosis de 210 mg/Kg de peso corporal (NOM-062-ZOO-1999 Artículo 9.4.). Se obtuvo tejidos: hígado y riñón para el análisis histopatológico.

3. Evaluar el efecto hipoglucemiante a largo plazo del cacalol sobre la memoria y aprendizaje en animales con resistencia a la insulina inducida por dieta

Animales de experimentación: Para esta etapa se utilizaron ratones macho mantenidos en el bioterio como se estableció en el punto 2 de la metodología. Para cumplir con este objetivo los animales de dos meses de edad (N total = 20 animales, 10 animales por grupo) fueron divididos en dos grupos: 1) Dieta rica en grasa (60% ácidos grasos saturados) y 2) Dieta normal. La dieta rica en grasa fue utilizada para inducir un estado de resistencia a la insulina por lo que los animales fueron tratados durante ocho semanas con ese tipo de dieta. En la semana cuatro de la dieta rica en grasa se administró por vía enteral (sonda esófago-gástrica) el extracto de matarique (N= 5 animales) o vehículo (N= 5 animales) y se administró una vez al día durante cuatro semanas, lo mismo para el grupo con dieta normal. Para el tratamiento

con el extracto, solamente se utilizó la dosis que tuvo el mejor efecto en los estudios conductuales del objetivo 2 de este protocolo. Se mantuvo a los animales en el régimen de dieta rica en grasa hasta cumplir las 8 semanas totales iniciales.

Estudios conductuales: Inmediatamente, al término de los tratamientos con dieta rica en grasa o con dieta normal se realizaron las pruebas conductuales de reconocimiento de objetos nuevo y del laberinto acuático de Morris, como se explicó anteriormente.

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por quintuplicado en eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó por Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar si existe diferencias entre los diferentes grupos a estudiar y después se utilizó la prueba de t-Student para determinar diferencias entre dos grupos: grupo experimental vs grupo control (vehículo). En el caso de la comparación entre los distintos grupos con las fracciones enriquecidas se utilizó después de la ANOVA una prueba de comparación múltiple como es la Tukey-Kramer. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$. Se utilizó el software de análisis estadístico llamado GraphPad Prism, Versión 7.0

Aspectos éticos y de bioseguridad

Los animales de experimentación utilizados en este estudio fueron mantenidos desde su recepción hasta la conclusión de cada fase experimental en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza de la UNAM, el cual se encuentra equipado e instalado para la producción y cuidado de especies pequeñas (roedores) que se requieren para la ejecución de los proyectos de investigación. El bioterio recibe animales tanto de compañías internacionales dedicadas a la venta de animales de experimentación, así como a su propia crianza y producción de roedores de diferentes especies (ratas o ratones) o de distintas cepas (CVZII, C57BL6, Wistar, Sprague Dawley). El bioterio cuenta con dos unidades, cada una al cuidado de ratas o ratones para que no se trabaje con las mismas especies en el mismo espacio físico. El mantenimiento, cuidado y manejo de los animales de experimentación utilizados en este estudio, se llevó bajo las estrictas normas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, como ha sido mencionado anteriormente en el apartado de metodología. Los residuos biológicos fueron manipulados bajo el siguiente esquema: los materiales (consumibles) desechables que hayan sido utilizados y hayan estado en contacto con sangre o tejidos, como son: guantes, puntas de micropipeta, papel absorbente, tubos eppendorff, pipetas serológicas, etc., fueron colocados en contenedores de poliuretano color rojo y transferidos para ser inactivados por incineración. Todos los materiales no desechables como son: material de disección o material de vidrio que hayan estado en contacto con sangre y tejidos fueron cubiertos por solución de hipoclorito de sodio durante 24 horas para inactivación de cualquier agente infectocontagioso, se desechó la solución en la tarja del laboratorio y se procedió al lavado y secado convencional del material para su limpieza y reutilización en ensayos posteriores. Sobre todo, el material de disección se esterilizó utilizando un aparato (germinator) eléctrico de mesa para laboratorios de investigación básica el cual a través de alta temperatura a base de cuentas de vidrio ayuda a eliminar por completo cualquier agente infectocontagioso en las puntas del material de disección. Todos los cuerpos de los animales experimentales sacrificados fueron envueltos en papel y transportados en bolsas de plástico proporcionadas por el bioterio, para ser trasladados a los congeladores del bioterio para su incineración final. Todos los desechos de la cama de los animales (aserrín) con desechos fisiológicos (heces y orina de los animales) fueron colocados en los recipientes destinados en el interior del bioterio para su manejo.

RESULTADOS

Figura 1. Efecto del tratamiento crónico con diferentes extractos de matarique: F1 (fracción hexánica); 2) F2 (fracción metanólica); 3) F3 (fracción etanólica); 4) F4 (fracción acuosa) y 5) vehículo sobre la memoria espacial (laberinto acuático de Morris) en ratones sanos tratados durante un mes con los diferentes extractos a partir de los 2 meses de edad. Panel superior: 20 mg/Kg; panel medio: 80 mg/Kg y panel inferior: 160 mg/Kg. La fracción F1 generó los mejores resultados. Datos expresados promedio \pm E.E. * $p < 0.05$.

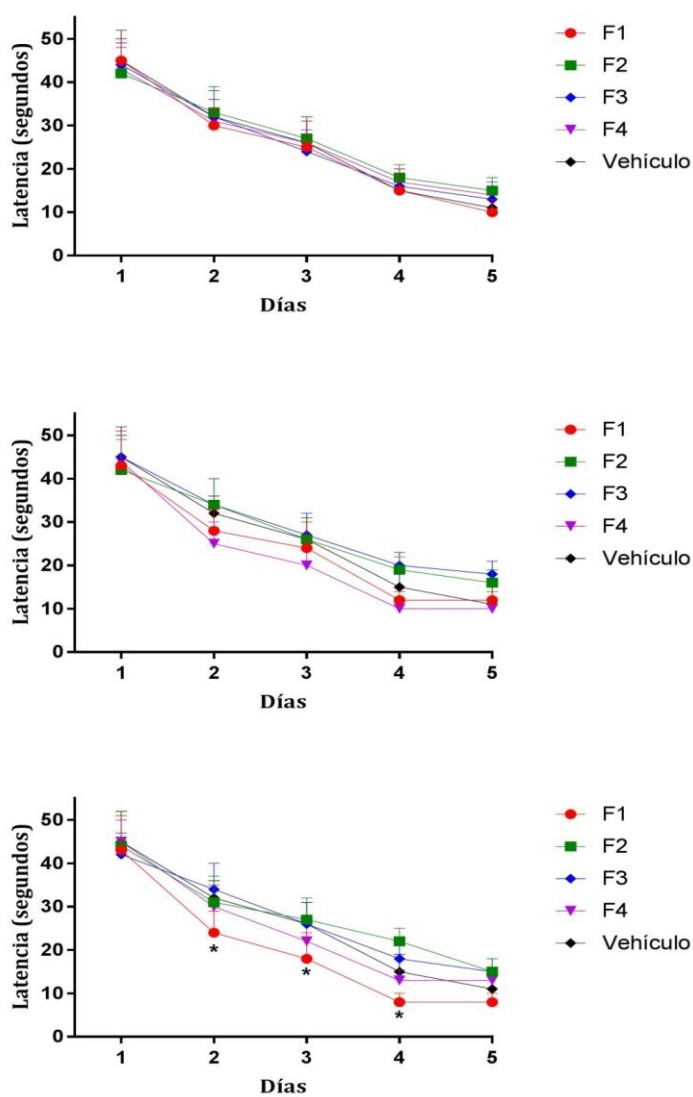
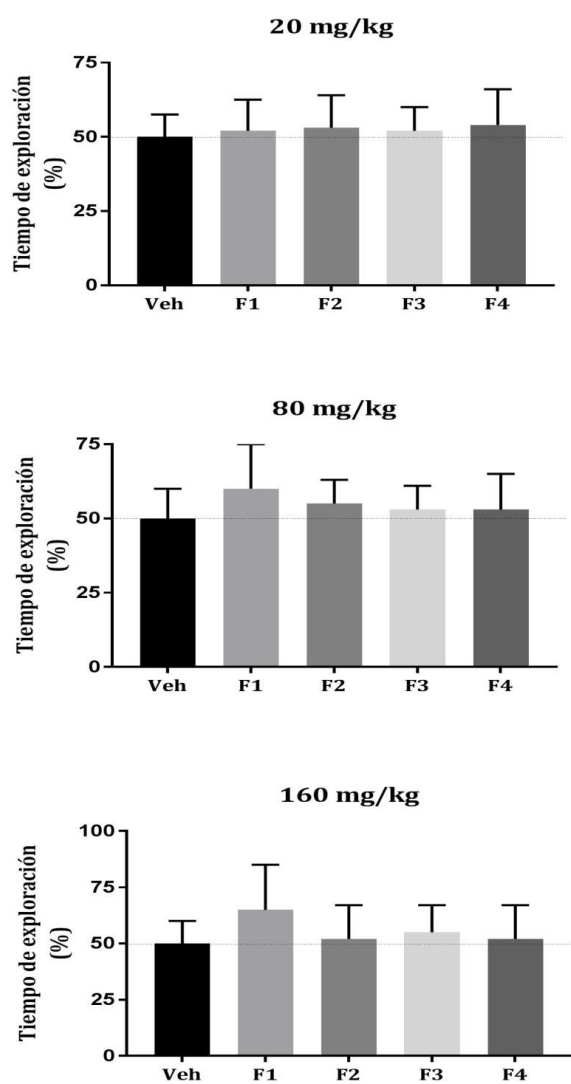


Figura 2. Efecto del tratamiento crónico con diferentes extractos de matarique: F1 (fracción hexánica); 2) F2 (fracción metanólica); 3) F3 (fracción etanólica); 4) F4 (fracción acuosa) y 5) vehículo sobre la memoria no espacial (reconocimiento de objetos nuevos) en ratones sanos tratados durante un mes con los diferentes extractos a partir de los 2 meses de edad. Panel superior: 20 mg/Kg; panel medio: 80 mg/Kg y panel inferior: 160 mg/Kg. La fracción F1 generó los mejores resultados. Datos expresados promedio \pm E.E.



DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio es evaluar los efectos anti-diabetogénicos del cacalol, para mejorar la memoria y aprendizaje en un modelo de ratón agravado por resistencia a la insulina y es un intento preliminar para encontrar nuevas sustancias alternativas potencialmente terapéuticas para el manejo farmacológico de personas con demencia agravada por diabetes mellitus DM2.

Nuestros resultados revelan que la administración crónica de diferentes extractos de matarique poseen efectos sobre las pruebas de memoria espacial y memoria no espacial. Las dosis que registraron mayores efectos fueron la de 80 mg/kg y 160 mg/kg. El extracto hexánico de *P. decompositum* a una dosis de 160 mg/kg es el que posee mayor efecto en las pruebas realizadas, mejorando significativamente los parámetros evaluados.

Los mecanismos por los que la DM2 impacta en el desarrollo de la EA aún no han sido totalmente esclarecidos, sin embargo, se sabe que la resistencia a la insulina (RI), es un factor de riesgo, para la aceleración del deterioro cognitivo (Whitmer RA., 2007; Whitmer RA., *et al.*, 2008).

Se sabe que el cacalol y sus derivados poseen actividad hipoglucemiante (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 2000). Sin embargo, no hay evidencia experimental que pudiera respaldar que este compuesto tiene un efecto sobre la memoria y aprendizaje.

Algunos estudios demuestran que el cacalol es el principal compuesto obtenido de la fracción hexánica del extracto de las raíces de *P. decompositum* (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 1997; Inman., 1999). El cacalol, un componente con propiedades anti-diabetogénicas, puede inducir una disminución en la glucosa sanguínea en ratones diabéticos (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha propuesto a la RI como un factor de riesgo para acelerar el deterioro cognitivo y conductual en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Leibson Cl., *et al.*, 1997; Ohara T., *et al.*, 2011; Ott A., *et al.*, 1999; Peila R., *et al.*, 2002). Por lo tanto, el efecto hipoglucemiante del extracto de *P. decompositum* puede ayudar de forma indirecta a que algunas regiones del cerebro involucradas con la memoria y aprendizaje sean menos afectadas por los efectos derivados de la resistencia a la insulina como es la hiperglucemia. Ya que como se mencionó anteriormente, la RI puede acelerar el deterioro cognitivo.

El receptor a insulina se ha detectado en altas concentraciones en diversas áreas del cerebro como el hipocampo y la corteza en cerebros de roedores y de humanos. Estas áreas están relacionadas con importantes funciones cognitivas como la memoria y aprendizaje (Unger JW., *et al.*, 1991; Schulingkamp RJ., *et al.*, 2000). Por lo que la deficiencia en la regulación de la hiperglucemia puede alterar la homeostasis de estas funciones.

Lo anterior puede explicar por qué con la fracción (F1) se obtuvieron los mejores resultados en ambas pruebas, tanto en la curva de aprendizaje, así como en el tiempo de exploración, ya que la fracción F1 a una dosis de 160 mg/kg es la que mayor concentración de cacalol posee, entonces, las propiedades anti-diabetogénicas que inducen una disminución en la glucosa sanguínea (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 2000) pueden ser más evidentes que a dosis menores, por lo que estos efectos pueden coadyubar a reducir el impacto negativo de la hipoglucemia en algunas áreas del cerebro involucradas en la memoria como como el hipocampo y la corteza.

Estos resultados sugieren que el extracto hexánico contiene mayor cantidad de cacalol, sustancia con actividad hipoglucemiante, confirmando lo reportado por (Alarcon-Aguilar FJ., *et al.*, 1997; Inman., 1999). Además, parece probable que la actividad biológica del compuesto puede derivar en un efecto positivo sobre la memoria y aprendizaje. Sin embargo, se llevarán a cabo más estudios para evaluar los efectos que pudiera tener en otras áreas de del cerebro relacionadas con el deterioro cognitivo agravado por diabetes mellitus DM2.

CONCLUSIONES

Con esta evidencia, se concluye que el extracto de *P. decompositum* (matarique) exhibe actividad sobre la memoria y aprendizaje en ratones con resistencia a la insulina. Estos resultados sugieren que el cacalol y su efecto hipoglucemiante pueden tener un impacto positivo sobre el deterioro cognitivo agravado por la RI. Sin embargo, se llevarán a cabo más estudios sobre ensayos conductuales y de biología molecular, con la finalidad de ampliar la información sobre los efectos hipoglucemiantes del cacalol en áreas del cerebro relacionadas con memoria y aprendizaje.

REFERENCIAS

Abbott MA, Wells DG, Fallon JR. (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci.* 19(17):7300-8.

Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Gonzalez-Paredes B, Flores-Saenz JL. (1997) Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J Ethnopharmacol.* 55(3):171-177.

Alarcon-Aguilar FJ, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Roman-Ramos R. (2000) Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *J Ethnopharmacol.* 72(1-2):21-27.

Alarcon-Aguilar FJ, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Gonzalez-Paredes B, Contreras CC, Roman-Ramos R. (2000) Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol.* 69(3):207-215.

Annweiler C, Dursun E, Féron F, Gezen-Ak D, Kalueff AV, Littlejohns T, Llewellyn DJ, Millet P, Scott T, Tucker KL, Yilmazer S, Beauchet O. (2015) Vitamin D and cognition in older adults: updated international recommendations. *J Intern Med.* 277(1):45-57.

Berglund ED, Li CY, Poffenberger G, Ayala JE, Fueger PT, Willis SE, Jewell MM, Powers AC, Wasserman DH. (2008) Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes.* 57(7):1790-9.

Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. (2005) Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. 45(5):675-688.

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and

reproduction. *Science*. 289(5487):2122-5.

Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF.(2000) IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*. 407(6802):377-82.

Campos MG, Oropeza M, Torres-Sosa C, Jiménez-Estrada M, Reyes-Chilpa R. (2009) [Sesquiterpenoids from antidiabetic Psacalium decompositum block ATP sensitive potassium channels.](#) *J Ethnopharmacol*. 123(3):489-493.

Chen SY, Wright JW, Barnes CD. (1996) The neurochemical and behavioral effects of beta-amyloid peptide (25-35). *Brain Res* 720:54-60.

Christie JM, Wenthold RJ, Monaghan DT. (1999) Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *J Neurochem*. Apr;72(4):1523-8.

Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D Jr. (1998) Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology*. 50(1):164-8.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (Ensanut 2012). Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaría de Salud. México.

Frick KM, Berger-Sweeney J. (2001) Spatial reference memory and neocortical neurochemistry vary with the estrous cycle in C57BL/6mice. *Behav Neurosci*. 115:229-37.

Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Türk A, Hoyer S, Zöchling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P. (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 105(4-5):423-38.

Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H. (2001) Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci.* 21(8):2561-70.

Gutiérrez Robledo LM y Arrieta Cruz I (coords.) (2014). Plan de acción Alzheimer y otras demencias. México. Instituto Nacional de Geriátria/Secretaría de Salud.

Hardy JA, Higgins GA. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.

Hong M, Lee V.M. (1997) Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J. Biol. Chem.*, **272**:19547–53.

Imfeld P, Bodmer M, Jick SS, Meier CR. (2012) Metformin, other antidiabetic drugs, and risk of Alzheimer's disease: a population-based case-control study. *J Am Geriatr Soc.* 60(5):916-921

Itoh A, Nitta A, Nadai M, Nishimura K, Hirose M, Hasegawa T, Nabeshima T. (1996) Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein-infused rats. *J Neurochem* 66:1113-1117.

Itoh A, Akaike T, Sokabe M, Nitta A, Iida R, Olariu A, Yamada K, Nabeshima T. (1999) Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of β -amyloid-infused rats. *Eur J Pharmacol* 382:167-175.

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med.* 6(2):143-50.

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido

TC. (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*. 292(5521):1550-2.

Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE. (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:5161–5166.

Jiménez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Navarro-Ocaña, Arrieta-Báez D. (2008) Reactivity of several reactive oxygen species (ROS) with the sesquiterpene cacalol. *Nat Prod Comm*. 3(4): 479-482.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 8(7):499-509.

Lannert H, Hoyer S. (1998) Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.*, **112**:1199–1208.

Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ. (1997) Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol*. 145(4):301-308.

Lesort M, Johnson GV. (2000) Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons. *Neuroscience*. 99(2):305-16

Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M, Wang YT, Sheng M. (2000) Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat Neurosci*. 3(12):1282-90.

Merino-Aguilar H. (2005) Estudio de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos de las raíces *Psacalium decompositum* Matarique en ratones sanos y diabéticos. Tesis para obtener el título de Biólogo presenta Héctor Merino Aguilar; asesor Manuel Jiménez Estrada. Universidad

Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias.

Mi K, Johnson GV. (2006) The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 3(5):449-63.

Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML. (2004) Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol.* 33:377–387

Moreira RO, Campos SC, Soldera AL.(2013) Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: from physiopathology to treatment implications. *Diabetes Metab Res Rev.* Jul 18.

Nag S, Yee BK, Tang F. (1999) Reduction in somatostatin and substance P levels and choline acetyltransferase activity in the cortex and hippocampus of the rat after chronic intracerebroventricular infusion of β -amyloid (1-40). *Brain Res Bull* 50:251-262.

Nelson JF, Bergman MD, Karelus K, Felicio LS. (1987) Aging of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis: hormonal influences and cellular mechanisms. *J Steroid Biochem.* 27:699-705.

Nitta A, Fukuta T, Hasegawa T, Nabeshima T. (1997) Continuous infusion of beta-amyloid protein into the rat cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration. *Jpn J Pharmacol* 73:51-57.

Nunes-Souza V, César-Gomes CJ, Da Fonseca LJ, Guedes Gda S, Smaniotto S, Rabelo LA. (2016) [Aging Increases Susceptibility to High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in C57BL/6 Mice: Improvement in Glycemic and Lipid Profile after Antioxidant Therapy.](#) *Oxid Med Cell Longev.* doi: 10.1155/2016/1987960.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39(3):409-421.

Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y. (2011) Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: The Hisayama Study. *77(12):1126-34.*

O'Hare E, Weldon DT, Mantyh PW, Ghilardi JR, Finke MP, Kuskowski MA, Maggio JE, Shephard RA, Cleary J. (1999) Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta (1-42). *Brain Res 815:1-10.*

Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology 53(9):1937-42.*

Park CR. (2001) Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev. 25(4):311-23.*

Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ; Honolulu-Asia Aging Study. (2002) Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *51(4):1256-62.*

Qiu WQ, Folstein MF. (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging. 27(2):190-8.*

Rojano-Vilchis NA. (2015) Estudio fitoquímico, evaluación antiinflamatoria, regeneración in vitro y cuantificación del acetato de maturina de la planta medicinal psacalium peltatum (matarique). Tesis para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Biológicas, presenta Nadia Asseneth Rojano Vilchis; tutor principal de tesis Manuel Jiménez Estrada. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas.

Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev. 24(8):855-72.*

Selkoe DJ. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron 6:487-498.*

- Selkoe DJ. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81(2):741-66.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 27:2866–2875.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ.(2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 14:837–842.
- Shankar GM, Walsh DM. (2009) Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Aβeta. *Mol Neurodegener.* 4:48–62.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science.* 258(5079):126-9.
- Siddle K, Ursø B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, Soos MA. (2001) Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 4):513-25.
- Silva T, Reis J, Teixeira J, Borges F. (2014) Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes. *Ageing Res Rev.* 15:116-145.
- Stover KR, Campbell MA, Van Winssen CM, Brown RE. (2015) Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 289:29-38.
- Sweeney WA, Luedtke J, McDonald MP, Overmier JB. (1997) Intrahippocampal injections of exogenous beta-amyloid induce postdelay errors in an eight-arm radial maze. *Neurobiol Learn Mem* 68:97-101.

Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB. (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci.*7:1181–1183.

Unger JW, Livingston JN, Moss AM. (1991) Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol.* 36(5):343-62.

Van Goethem NP, Rutten K, van der Staay FJ, Jans LA, Akkerman S, Steinbusch HW, Blokland A, van't Klooster J, Prickaerts J. (2012) Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behav Brain Res.* 232:323-334.

Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Branton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT. (1997) Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature.* 388(6643):686-90.

Wang J, Ho L, Zhao Z, Seror I, Humala N, Dickstein DL, Thiyagarajan M, Percival SS, Talcott ST, Pasinetti GM (2006) Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 20(13):2313-20.

[Wang CY](#), [Liao JK](#). (2012) A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. [Methods Mol Biol.](#) 821:421-33.

Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R. (2010) Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci.* 13:190–196.

Whitmer RA. Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. (2007) *Curr Neurol Neurosci Rep.* 7(5):373-80.

Whitmer RA, Gustafson DR, Barrett-Connor E, Haan MN, Gunderson EP, Yaffe K. (2008) Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *71(14):1057-64.*

Winzell MS, Ahrén B. (2004) [The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes.](#) Diabetes. 53 Suppl 3:S215-9.

Zhao WQ, Alkon DL. (2001) Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. Mol Cell Endocrinol. 177(1-2):125-34.