

EFFECTO DE LA TIBOLONA SOBRE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS Y CONDUCTUALES EN RATAS OVARIECTOMIZADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA.

Flores-Flores Erendira^a, Huerta-Aguilar Josué Gabriel^a, Espinosa-Raya Judith^a

^aEscuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. ery1109@gmail.com

RESUMEN

La supresión de estrógenos que se presenta en la menopausia se relaciona con la disminución del gasto energético que contribuye al desarrollo de obesidad durante esta etapa. La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial que se caracteriza por un desequilibrio entre la ingesta alimentaria y el gasto energético, en donde se presenta una acumulación excesiva de grasa corporal por encima del valor esperado según el sexo, la talla y edad. La obesidad condiciona una mayor prevalencia de diabetes mellitus 2 (DM2), síndrome metabólico (SM), patologías cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Diversas líneas de investigación han vinculado a la menopausia con alteraciones metabólicas y cognitivas. Al respecto, hallazgos recientes sugieren la importancia de la insulina en diversas funciones del sistema nervioso central (SNC) y aunque no está claro el mecanismo, se ha observado que la resistencia a la insulina y la DM2 contribuyen al deterioro de la memoria hipocampo-dependiente. Estudios recientes sugieren que la terapia de reemplazo hormonal (TRH) se asocia a una reducción significativa de la resistencia a la insulina y por lo tanto del riesgo de desarrollar DM2, además de que puede prevenir y reducir la severidad del déficit cognitivo. En este trabajo proponemos estudiar el efecto de la Tibolona (TIB) sobre la ingesta alimentaria, ganancia ponderal, perfil de lípidos y alteraciones en la memoria, en ratas con ovariectomía (OVX) y sometidas a una dieta alta en grasa (DAG). Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley que estuvieron en condiciones constantes de temperatura y humedad, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas (9:00 pm – 9:00 am), con agua y comida *ad libitum*. A los sujetos de experimentación se les realizó ovariectomía (OVX) y dos semanas post-OVX se incluyeron en alguno de los siguientes grupos experimentales: OVX+DN+VEH; OVX+DAG+VEH; OVX+DAG+TIB 0.1; Las dietas fueron administradas durante 9 semanas, al grupo de DAG se administró una dieta 32 % de grasa a base de aceite de palma. En el grupo de DN se utilizó alimento estándar. Se realizó monitoreo diario de ingesta alimentaria, semanalmente de peso y mensualmente de glucosa y perfil de lípidos. Al finalizar el tiempo de tratamiento los animales fueron sometidos a la prueba de reconocimiento de objetos (ROB) y de actividad espontánea. Los resultados muestran que el grupo DAG+OVX+VEH muestra un mayor incremento ponderal. En la prueba de ROB, el grupo de OVX+DAG+VEH hay disminución del índice de reconocimiento.

*Agradecimientos: SIP-IPN, COFAA, CONACyT 182576.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial, que se presenta por un desequilibrio entre la ingestión alimentaria y el gasto energético. En su origen se involucran factores genéticos y ambientales, que determinan un trastorno metabólico que conduce a una acumulación excesiva de grasa corporal por encima del valor esperado según el sexo, talla y edad. La obesidad es el principal factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles que incluyen la resistencia a la insulina, Diabetes mellitus 2 (DM2), síndrome metabólico (SM) y patologías cardiovasculares. La obesidad es resultado de una compleja interacción de factores, sin embargo una dieta alta en alimentos hipercalóricos (con alto contenido de grasas y azúcares) es un elemento decisivo en la fisiopatología de la enfermedad. Diversos grupos de investigación han demostrado que la menopausia se asocia con el aumento en la prevalencia de obesidad y sobrepeso. Al respecto, los estrógenos modulan la secreción de la leptina, grelina e intervienen en la regulación del apetito, así como en la actividad de péptidos opioides endógenos. Por otro lado, los trastornos neurológicos más comunes relacionados con la menopausia son demencia debida a la enfermedad de Alzheimer, alteraciones en la memoria, aprendizaje y del estado de ánimo. Además, se ha vinculado a la menopausia con alteraciones metabólicas y cognitivas. Al respecto, hallazgos recientes sugieren la importancia de la insulina en diversas funciones del sistema nervioso central (SNC) y aunque no está

claro el mecanismo, se ha observado que la resistencia a la insulina y la DM2 contribuyen al deterioro de la memoria hipocampo-dependiente. Los mecanismos moleculares por los cuales la insulina promueve sus acciones en el SNC son similares a los que operan en tejidos periféricos. Estas acciones son mediadas por cascadas de señalización intracelular, que se activan por la unión de la insulina a su receptor (el receptor de insulina, RI). El RI se encuentra diferencialmente en las estructuras encefálicas y a densidades distintas. Una vez activado el RI activa la vía señalización IRS/PI3K/Akt que dirige la inhibición de la JNK (c-jun quinasa N-terminal) relacionada con la activación de la BCL-2 (por fosforilación en Ser87) y la continuación de una cascada apóptótica. También se ha observado que la insulina regula el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) y modula la actividad de las secretasas, disminuyendo los niveles de proteína β -amiloide (β A). Además, el RI se encuentra en las sinapsis de los árboles dendríticos donde regula la liberación de neurotransmisores y el reclutamiento de receptores. Algunas revisiones sugieren que la insulina regula receptores glutamatérgicos y GABAérgicos, a través de la activación de la vía de la PI3K y MAPK. Finamente, se ha observado que la TRH se asocia a una reducción significativa de la resistencia a la insulina y por lo tanto del riesgo de desarrollar DM2, además de que puede prevenir y reducir la severidad del déficit cognitivo. La TIB es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento del síndrome climatérico (asociado a la menopausia) y hay evidencia de que la TIB tiene efecto sobre algunos parámetros metabólicos tales como una disminución plasmática del colesterol total y triglicéridos sin embargo, la implicación clínica del efecto de la TIB sobre la obesidad, SM y diabetes no es clara.

2. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la TIB sobre la ingesta alimentaria, ganancia ponderal, perfil de lípidos y alteraciones en la memoria, en ratas con OVX y sometidas a una DAG.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley que estuvieron en condiciones constantes de temperatura y humedad, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas (9:00 pm – 9:00 am), con agua y comida *ad libitum*. A los sujetos de experimentación se les realizó OVX y dos semanas post-OVX se incluyeron en alguno de los siguientes grupos experimentales

OVX+DN+VEH n=10 Peso ~200	OVX+DAG+VEH n=10 Peso ~200	OVX+DAG+TIB 0.1 n=10 Peso ~200
---------------------------------	----------------------------------	--------------------------------------

Después de la cirugía se inició la dieta y la administración del tratamiento hormonal con TIB a una dosis de 0.1 mg/kg o su vehículo vía oral. Diariamente se hizo monitoreo de la ingesta de alimento y semanalmente del peso corporal de los roedores. A las 4 y 9 semanas se hicieron mediciones de glucosa, perfil de lípidos y triglicéridos. Finalmente, a las 9 semanas se realizó la prueba conductual.

DIETA

Una vez que los roedores fueron asignados a algún grupo experimental, se iniciaron dos tipos de dieta: 1) dieta normal y 2) dieta alta en grasa (aceite de palma).

MEDICIÓN DE GLUCOSA, PERFIL DE LÍPIDOS Y TRIGLICÉRIDOS.

Los niveles de glucosa, colesterol total y triglicéridos fueron evaluados por medio del equipo CardioChek™ (Polymer Technology Systems, Inc. Indianápolis, USA) y la muestra de sangre fue obtenida de la vena caudal.

MODELO DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

La tarea de reconocimiento de objetos está basada en el paradigma etológico de preferencia por la novedad. Este modelo ha sido utilizado para evaluar memoria episódica. La prueba se divide en una sesión de habituación al campo abierto y dos de interacción con los objetos en el campo abierto. Se utilizó un campo abierto de acrílico de 45 x 30 x 15 cm. En la sesión de habituación, los animales permanecerán en el campo abierto por 30 minutos y luego serán llevados a su jaula-hogar. Después de un intervalo de 24 horas se colocaron dos objetos del mismo tamaño y volumen en las esquinas del campo abierto, a las ratas se les dejará explorar por 5 minutos y luego serán llevadas a su caja hogar. Finalmente, luego de un intervalo de 1 y 24 horas, cada animal será colocado nuevamente en el campo abierto donde se les colocarán previamente un objeto familiar y uno novedoso y se les dejará explorar la arena por 5 minutos. En ésta prueba, se evaluó la frecuencia y el tiempo dedicado por los animales a la interacción con cada uno de los objetos y con los datos obtenidos se calculó el índice de reconocimiento.

PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA.

Para determinar que no haya alguna alteración motora que interfiera con la realización de la prueba de aprendizaje se evaluó la actividad espontánea de las ratas utilizando un aparato automático que contiene celdas fotoeléctricas cuya interrupción genera un impulso eléctrico que se procesa y genera un evento o cuenta (Opto-Varimex; Ugo Basile Italia). Esta evaluación se realizará en un cuarto completamente oscuro y durará 5 minutos, durante este tiempo se midieron los siguientes parámetros: actividad total, actividad ambulatoria y actividad vertical.

4. RESULTADOS

Inmediatamente después de la cirugía se iniciaron las dietas. Se hizo monitoreo diario de la cantidad de alimento ingerido por los roedores y semanalmente del peso corporal. Con el promedio de la ingesta diaria de alimento se realizó la figura 1a en donde se puede observar que el grupo de OVX+DN+VEH tienen una ingesta mayor que los otros grupos. Del promedio del peso corporal de los roedores se realizó la figura 1b en donde se observa que el grupo de OVX+DAG+VEH tiene mayor ganancia ponderal.

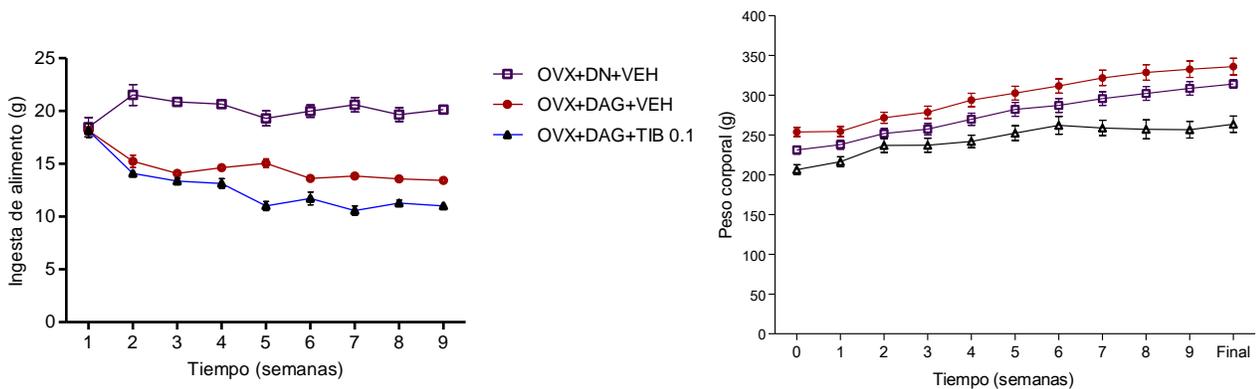


Figura 1. a) Ingesta diaria de alimento (g) en los grupos experimentales durante 9 semanas. b) Efecto de la dieta sobre el peso corporal. Cada barra representa la media \pm EE, n=10. *p<0.05 vs OVX+DN+VEH. OVX+DN+VEH: ovariectomía, dieta normal y Vehículo. OVX+DAG+VEH: ovariectomía, dieta alta en grasa y vehículo. OVX+DAG+TIB 0.1 ovariectomía, dieta alta en grasa y TIB 0.1 mg/kg

A las 4 y 9 semanas del tratamiento, a todos los grupos experimentales se les determinaron los siguientes parámetros bioquímicos: a) glucosa, y b) colesterol HDL y d) triglicéridos. De estos datos se obtuvo la figura 2. Se observa que a las cuatro semanas ningún parámetro se modifica, sin embargo en

el grupo de OVX+DAG+VEH a las nueve semanas hay un aumento de los niveles de glucosa y triglicéridos.

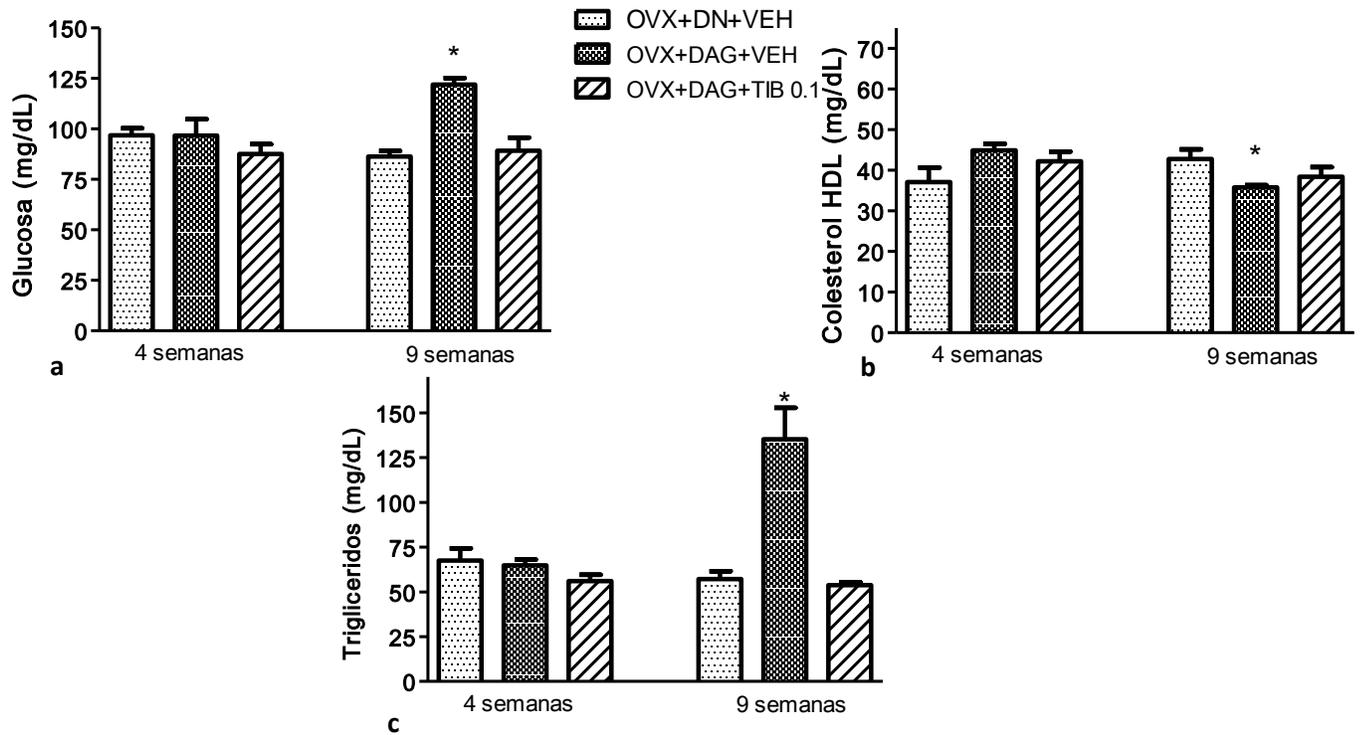


Figura 2. Efecto de la dieta sobre a) glucosa, b) colesterol total, c) colesterol HDL y d) triglicéridos. Se representa EE, n=10. *p<0.05 vs OVX+DN+VEH. OVX+DN+VEH: ovariectomía, dieta normal y Vehículo. OVX+DAG+VEH: ovariectomía, dieta alta en grasa y vehículo. OVX+DAG+TIB 0.1 ovariectomía, dieta alta en grasa y TIB 0.1 mg/kg

La figura 3 muestra los resultados del índice de reconocimiento en la prueba de ROB, 1 y 24 horas después de la exposición a los objetos familiares. Al analizar los datos se observó diferencia significativa en el grupo de OVX+DAG+VEH con respecto al grupo control.

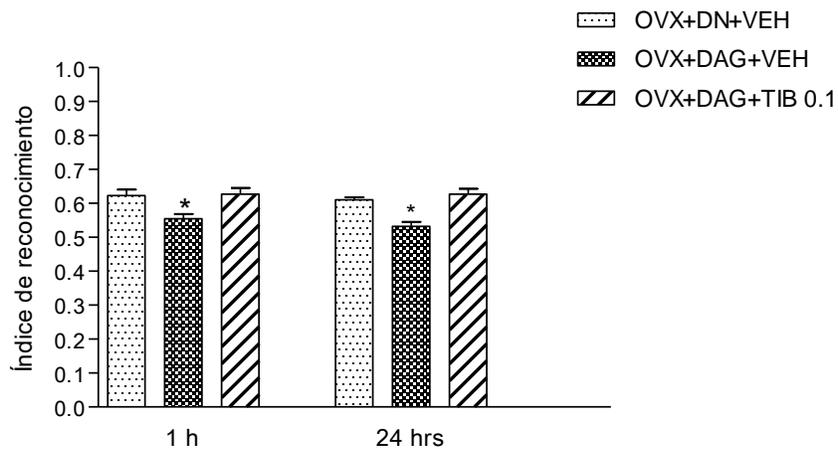


Figura 3. Efecto de la dieta sobre la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada en un modelo de reconocimiento de objeto nuevo. Se representa EE, n=10. *p<0.05 vs OVX+DN+VEH. OVX+DN+VEH: ovariectomía, dieta normal y Vehículo. OVX+DAG+VEH: ovariectomía, dieta alta en grasa y vehículo. OVX+DAG+TIB 0.1 ovariectomía, dieta alta en grasa y TIB 0.1 mg/kg.

Con el fin de descartar alguna alteración locomotriz que hubiera interferido con prueba de aprendizaje se evaluó la actividad espontánea a todos los roedores. Con los resultados se obtuvo la figura 5. En ningún caso hay diferencia significativa.

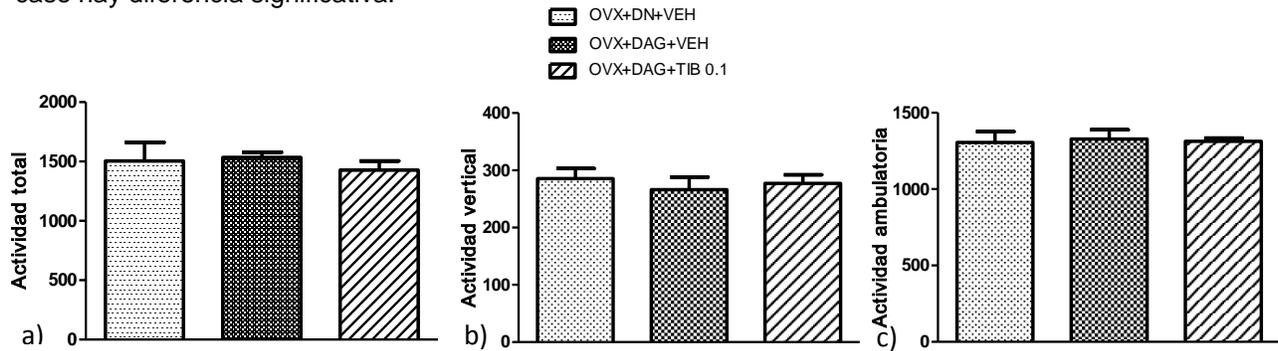


Figura 5. Efecto de la dieta sobre la a) actividad total, b) vertical y c) ambulatoria. Cada barra representa la media \pm EE del número de cuentas de la actividad total en 5 minutos, n=5. DN+Intactas: Dieta normal+Intactas. DAG+SHAM: Dieta alta en grasa+Cirugía simulada. DAG+OVX: Dieta alta en grasa+Ovariectomía.

5. CONCLUSION

El hipoestrogenismo condicionado por la OVX parece modificar la ingesta de alimento, la ganancia ponderal, así como la glucosa basal y el perfil de lípidos. Los datos obtenidos sugieren que la DAG disminuye el índice de reconocimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban DC, *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000; 289: 2122-2125.
2. Dhandapani KM, Brann DW. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod*. 2002; 67(5):1379-1385.
3. Gerozissis K, Rouch C, Lemierre S, Nicolaidis S, Orosco M. A potential role of central insulin in learning and memory related to feeding. *Cel Mol Neurobiol*. 2001; 21: 389-401.
4. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes*. 2004; 53(2):474-481.
5. McEwen BS. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol*. 2001; 91(6):2785-2801.
6. Myers MG Jr y White MF. The Molecular Basis of Insulin Action: Insulin Signaling, from cultured cells to animal models. Gruenberg G, Zick, Taylor and Francis, New York, 2002. pp 55-87.
7. Reagan LP. Insulin signaling effects on memory and mood. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(6):633-637.
8. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005; 7(1):63-80.
9. Turgeon JL, McDonnell DP, Martin KA, Wise PM. Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science*. 2004; 304(5675):1269-1273.
10. Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, *et al.* Brain insulin receptors and spatial memory. *J Biol Chem*. 1999; 274:34893-34902.