



**Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud  
Carrera de Medicina**

**Año 2023  
Trabajo Final de Carrera (Tesis)**

**Aspectos neurológicos en alteraciones  
metabólicas. Hipoxia cerebral**

**Neurological aspects in metabolic disorders.  
Cerebral hypoxia**

**Alumno:**

***Galiano Fontana Azul Agustina***

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4295-9044>*

*azulagustina.galianofontana@alumnos.uai.edu.ar*

*Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud - Universidad Abierta Interamericana*

**Tutor:**

***Luaces Juan Pablo***

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7758-6052>*

*juanpablo.luaces@uai.edu.ar*

*Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud - Universidad Abierta Interamericana*

## **Agradecimientos:**

*En principio a mi tutor, por orientarme, enseñarme y apoyarme en cada etapa de este trabajo, donde todo fue una nueva experiencia y aprendizaje para mí. Siempre dándome el lugar para participar y ser parte del proyecto.*

*A todo el equipo del laboratorio, quienes estuvieron en el día a día del proyecto brindando el lugar, los elementos, las herramientas, su tiempo, conocimientos y lo mejor de cada uno para que sea posible.*

*Sin dudas a mi familia, quienes siempre están presentes, apoyándome en los buenos y malos momentos de la carrera, admirando cada paso que fui dando en este largo aprendizaje. A mi bisabuela, Antonia, que siempre me dio su apoyo incondicional en cada charla y nunca perdió la fe en mí, aunque ya no esté presente le dedico toda mi carrera.*

*No podría dejar de agradecer a mis amigas, las cuales saben el esfuerzo, tiempo y dedicación que se necesita para avanzar y aun así siempre estuvieron a mi lado.*

*A mi pareja, quien estuvo a mi lado a lo largo de la carrera, apoyándome día a día incluso en los malos momentos.*

*Gracias a todos los que fueron parte de mi carrera y experiencia.*

# Aspectos neurológicos en alteraciones metabólicas. Hipoxia cerebral

## Neurological aspects in metabolic disorders. Cerebral hypoxia

*Autores: Azul Agustina Galiano Fontana, Juan Pablo Luaces.*

### Resumen

**Introducción:** El síndrome metabólico (SM) es la condición resultante de enfermedades concurrentes específicas, cuyo componente fisiopatológico común es la resistencia a la insulina. Existe consenso sobre la presencia del SM siempre que se encuentren presentes factores de riesgo como obesidad abdominal, hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipertensión. El SM es un potente factor de riesgo para el accidente cerebrovascular, que se asocia con aumento de lesiones cerebrales isquémicas silenciosas, antesala de un derrame cerebral clínico o del desarrollo de demencia, asociándose con envejecimiento acelerado y con deterioro cognitivo en adultos de edad avanzada.

**Objetivos:** Se determinó si el SM, inducido por consumo crónico de bebida cola en un modelo murino, se asocia con cambios en el tejido cerebral.

**Material y métodos:** Se administró bebida cola durante 5 meses a Ratas Wistar macho de 2 meses de edad. Se realizaron secciones coronales de hipocampo para inmunohistoquímica y se estudiaron los siguientes anticuerpos: Map-2 y pNF-H/M.

**Resultados y conclusiones** En el presente trabajo se registró un aumento del consumo de bebida en animales expuestos a bebida cola respecto a animales expuestos a agua. Luego de 5 meses de tratamiento con bebida coca se observaron cambios en la inmunolocalización del marcador MAP-2 en el hipocampo.. El modelo del presente trabajo puede ser utilizado en otros estudios sobre la patogénesis del síndrome metabólico y sus consecuencias a nivel cerebral.

**Palabras Clave:** Insulin resistance; Metabolic síndrome; hypoxia, brain; neurodegenerative diseases.

## INTRODUCCIÓN

*El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por la coexistencia de factores de riesgo como obesidad abdominal, dislipemia aterogénica, hipertensión arterial, estado protrombótico y proinflamatorio, resistencia a la insulina (RI) y mayores niveles de glucosa, factores indudablemente vinculados a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares (1). Los trastornos se evalúan utilizando seis índices para hacer el diagnóstico de SM: circunferencia de la cintura, niveles de glucosa en ayunas, niveles de triglicéridos, niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), niveles de colesterol y presión arterial (2).*

*La hipótesis más ampliamente aceptada para la fisiopatología subyacente del síndrome metabólico es la resistencia a la insulina, impulsada en por el exceso de ácidos grasos como consecuencia de una lipólisis inapropiada (3).*

*La insulina es una hormona secretada por los islotes de Langerhans en el páncreas; estimula el transporte de glucosa al músculo, al tejido adiposo y al hígado. La falta de regulación de la glucosa conduce a la diabetes y enfermedades cardiovasculares (4). La RI es un estado patológico de alteración entre la síntesis de insulina y su acción en los tejidos. En esta condición, la sensibilidad de los tejidos a la insulina se reduce, lo que resulta en una alteración de la homeostasis de la glucosa (5).*

*El transporte de glucosa estimulado por la insulina hacia el interior de las células se logra mediante la unión de la insulina a su receptor de superficie celular y el inicio de una cascada de eventos de señalización que culminan en la redistribución de GLUT4 (el transportador de glucosa sensible a la insulina) a la membrana plasmática. Luego, la glucosa se transporta a través de la membrana plasmática, donde se fosforila inmediatamente y se almacena como glucógeno o se metaboliza para producir ATP (6). La actividad de las enzimas de señalización, cinasa fosfatidilinositol 3 y cinasa MAP es afectada, lo que conduce a una disminución de la translocación del transportador GLUT-4 a la superficie y, por lo tanto, a una menor captación de glucosa (2). Las deficiencias en la señalización de la insulina interrumpen la entrada de glucosa en los adipocitos y las células del músculo esquelético. Aunque la causa exacta de la RI no se ha dilucidado por completo, se han sugerido una serie de mecanismos importantes, que incluyen estrés oxidativo, inflamación, mutaciones del receptor de insulina, estrés del retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial (7). El SM también representa un factor de riesgo para el tejido nervioso y amenaza la función neuronal (8). Todas las células del organismo tienen receptores de insulina, pero son más abundantes y su acción es más clara en el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético (9). Los ácidos grasos libres se derivan principalmente de los depósitos de triglicéridos en el tejido adiposo, liberados por la acción del AMP cíclico durante la lipólisis. En el*

*músculo esquelético, los ácidos grasos libres pueden inhibir la absorción de glucosa (3). El cerebro depende de la glucosa como fuente principal de energía, y una estricta regulación del metabolismo de la glucosa y las reservas de ATP son fundamentales para la fisiología cerebral (8). Los requisitos de energía del cerebro son altos, y la viabilidad neuronal depende de manera crítica del suministro de oxígeno y nutrientes del flujo sanguíneo cerebral (10).*

*La insulina desempeña un papel crucial en el procesamiento de la memoria en el hipocampo a través de los receptores de insulina (11). La disfunción microvascular está particularmente asociada con SM, la degeneración vascular provoca una circulación defectuosa, que a su vez conduce a la hipoxia en órganos diana como el cerebro (8). Las células endoteliales interactúan con pericitos, células gliales y neuronas. La disfunción endotelial generalmente se asocia con el síndrome metabólico y afecta la distribución del flujo sanguíneo cerebral y la integridad de la unidad neurovascular, lo que provoca hipoperfusión cerebral crónica (10).*

*La resistencia a la insulina específica del hipocampo podría perjudicar el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica. La insulina tiene la capacidad de regular el metabolismo neuronal y, en particular, desencadena la absorción de glucosa en el hipocampo y el lóbulo temporal medio (11). Las personas con SM no solo tienen una mayor probabilidad de disfunción microvascular, sino que también son más susceptibles al daño durante los eventos de isquemia-reperusión (8).*

*La reducción prolongada en el suministro de oxígeno y energía conduce a la hipoxia cerebral y al mal plegamiento de proteínas. El plegamiento incorrecto de proteínas da como resultado la neurodegeneración. La concurrencia de tres o más factores de riesgo del SM conduce a una disminución sustancial del flujo sanguíneo cerebral principalmente en las áreas mediolaterales de la materia gris frontal, parietal, temporal y occipital y al debilitamiento de la memoria inmediata, atención, velocidad de procesamiento, funciones ejecutivas, inteligencia fluida y el procesamiento viso espacial (10).*

*Las mediciones antropométricas de laboratorio han respaldado la interacción entre SM, resistencia a la insulina e hipoperfusión cerebral crónica (HCC), así como su vínculo con la enfermedad de Alzheimer (EA) y/o el deterioro cognitivo vascular y la demencia (DCVD). Asimismo, las evaluaciones preclínicas han contribuido al conocimiento de la etiología de la DCVD y la EA, lo que sugiere que el plegamiento y la agregación de proteínas son características fisiopatológicas comunes (11). Se han desarrollado diferentes paradigmas animales para reproducir el SM tal como se presenta en humanos. Últimamente, la cantidad de estudios experimentales que se asemejan a SM, diabetes tipo 2 y HCC ha aumentado significativamente (12). La investigación traslacional ha explorado en qué medida el SM o la diabetes tipo 2 pueden*

causar HCC, utilizando diferentes marcadores de flujo sanguíneo cerebral. Además, estudios recientes que combinan dos o tres modelos murinos han intentado desentrañar los distintos mecanismos de neurodegeneración.

En los últimos años, la investigación también ha contribuido al descubrimiento de posibles estrategias neuroprotectoras dirigidas a la red de proteostasis (13,14,15), es decir, la maquinaria para la biogénesis, plegamiento, mantenimiento y degradación de proteínas con chaperonas moleculares como coordinadores clave.

La cepa de ratas más utilizada para estudiar SM es la de las ratas obesas Zucker, en la que los animales presentan alteraciones similares a las observadas en sujetos humanos (16). En 1961, Lois Zucker desarrolló esta cepa de ratas a través de la mutación en la leptina que genera la obesidad a partir de la tercera semana de vida (17). La regulación al alza de esa hormona, que se sintetiza en el tejido adiposo y actúa sobre los receptores cerebrales (18), constituye el mecanismo molecular del fenotipo característico de la cepa de rata Zucker: hiperfagia, depósito de energía en el tejido adiposo, dislipidemia, leve intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y alteraciones vasculares (16,19)

También se encuentra el modelo Wistar Ottawa Karslburg (WOKW), el cual, a diferencia de las ratas obesas Zucker, no provoca enfermedades cardiovasculares por una mutación de un solo gen. De esta manera, reproduce condiciones patológicas en el contexto clínico. La desventaja de este abordaje preclínico es que reproduce el SM entre las 8 y 10 semanas de vida (16)

Otros métodos experimentales pretenden ensamblar el perfil de anomalías que presentan los pacientes con SM. El consumo de bebidas carbonatadas dulces, la dieta alta en grasas y el modelo de baja capacidad aeróbica se centran en las variables ambientales en la etiología del SM, específicamente en los factores de riesgo de la dieta y el estilo de vida (20)

Con respecto al modelo de baja capacidad aeróbica, esta se induce artificialmente, provocando la aparición de enfermedades cardiovasculares (21). Las ratas con baja capacidad aeróbica se seleccionan teniendo en cuenta su eficiencia en una tarea de carrera, perteneciendo al grupo que sólo puede correr distancias cortas debido a una baja capacidad aeróbica intrínseca. Estos animales se cruzan entre sí hasta llegar a la 11ª generación, en la que se observa hipertensión arterial, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y disfunción endotelial (16)

Las ratas con dieta alta en grasas presentan intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2 ya que contienen alrededor del 58% del suministro total de energía proveniente de una mayor ingesta de energía, además de una menor eficiencia metabólica durante la primera semana de edad (22)

En el modelo de consumo de bebidas carbonatadas dulces, una ingesta ad libitum de esa fuente líquida durante un período considerable de tiempo conduce a hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, sobrepeso,

hipertensión sistólica, alteraciones cardíacas y renales, y estrés oxidativo (23, 24, 25, 26, 27, 28).

Si bien se han llevado a cabo investigaciones en SM con modelos de alto consumo de bebidas cola con azúcar, aún no deben establecerse parámetros que estén asociados a neurodegeneración en modelos de síndrome metabólico. Por lo tanto, en este trabajo se tomó un modelo de síndrome metabólico de consumo de bebida cola previamente desarrollado en el laboratorio en que se llevó a cabo la presente investigación (22, 25, 26, 27) con el fin de determinar si el SM inducido por consumo crónico de bebida cola produce neurodegeneración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES

Dieciocho ratas Wistar macho adultas de 2 meses de edad fueron distribuidas en 3 grupos (n=6 cada grupo) según el tratamiento: Grupo W (bebida ad libitum; agua), Grupo C (bebida ad libitum; bebida cola común). A los 5 meses del inicio del experimento se administró eutanasia (pentobarbital 40mg/kg de peso corporal, i.p.) a los animales en cada grupo.

Las condiciones de temperatura y humedad fueron  $22\pm 2$  C° y  $65\pm 5\%$  respectivamente. Se empleó un ciclo de luz/oscuridad de 12:12, comenzando el período de luz a las 7am. Se les proporcionó alimento balanceado, bebida cola y agua natural ad libitum.

A fin de minimizar el sufrimiento de los animales, todos los experimentos descritos a continuación se llevaron a cabo de acuerdo con los principios que establece la Guía para el Cuidado y el Uso de animales de Laboratorio.

### DESARROLLO DEL MODELO Y MEDICIÓN DE CONSUMO DE BEBIDA

Durante los 6 meses del experimento se controló y registró en un documento excel el peso de cada animal, el consumo de bebida cola, el consumo de agua y el consumo de alimento balanceado.

Cada animal fue pesado semanalmente con balanza de precisión. El volumen de bebida fue determinado diariamente y se repuso el líquido de bebida de ser necesario. Al cabo de una semana de medición se determinó el consumo semanal para cada grupo.

### INMUNOHISTOQUÍMICA

Al cabo de 5 meses de experimento, las ratas fueron anestesiadas (Ketamina 100mg/kg + Xilacina 5mg/kg) y perfundidos con paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, MO, USA). Se extrajo el cerebro que luego fue post-fijado durante 2 horas en el mismo fijador. Luego se obtuvieron secciones coronales de cerebro para el estudio del hipocampo usando Vibrátomo (Oxford). Se utilizaron los siguientes marcadores de daño neuronal y respuesta glial: neurofilamentos fosforilados de alto/medio peso molecular (pNF-H/M) y proteínas asociadas a los microtúbulos 2 (MAP-2). Las secciones fueron bloqueadas

con suero normal de bovino al 3% (Invitrogen, CA, USA) durante 60 minutos y luego son incubadas a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios. Subsecuentemente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidada (1:500; Vector Laboratories Inc., CA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio óptico (Laborlux S, Leitz) y programa de tratamiento de imágenes (Adobe Photoshop 11.0 CSA).

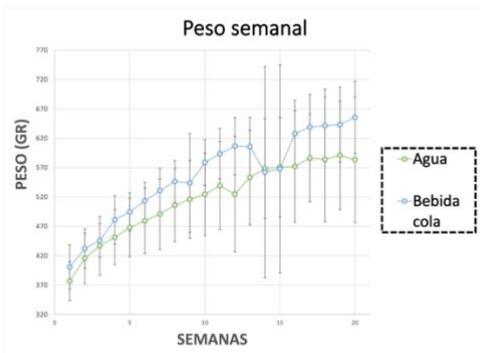
#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron con el test de ANOVAs; se consideró significativo un valor  $p < 0,05$ . Se utilizó software SPSS™ versión 20.0.

## RESULTADOS

### Inducción del modelo de síndrome metabólico en ratas Wistar, consumo de bebida y ganancia de peso.

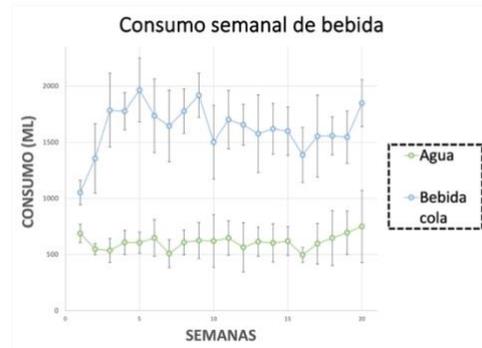
El seguimiento del peso en los grupos de animales que fueran expuestos a agua (W) y bebida cola (C) registró una tendencia al incremento en el grupo de ratas expuestas a bebida cola a la cuarta semana de tratamiento (Fig. 1). Luego a la doceava semana la tendencia a la diferencia de peso fue máxima y se mantuvo al final del experimento a veinteva semana. Las diferencias no resultaron significativas entre los grupos W y C.



**Figura 1:** curva de evolución de peso en los grupos Agua (en verde) y Bebida cola (en azul) durante 24 semanas de tratamiento

El consumo de bebida fue determinado semanalmente. Al inicio del experimento se observaron diferencias de entre los grupos, en el C se registró un consumo 1,8 veces mayor de bebida respecto al grupo W (Fig. 2,  $p < 0,05$ ). A

la quinta semana de experimento la diferencia de consumo fue máxima, registrando valores en el grupo C que triplicaron los registrados en el grupo W (Fig. 2,  $p < 0,05$ ). Hacia el final de experimento el consumo del grupo C duplicó al consumo del grupo W (Fig 2,  $p < 0,05$ ).



**Figura 2:** consumo semanal de bebida en los grupos Agua (en verde) y Bebida cola (en azul) durante 20 semanas de tratamiento.

### Evaluación de marcadores de neurodegeneración en el hipocampo por inmunohistoquímica

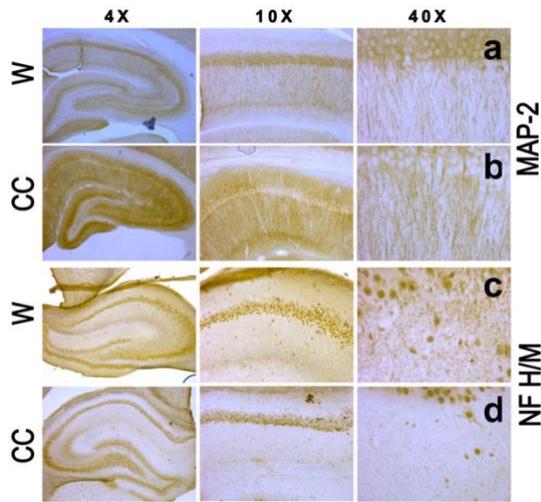
Con el objetivo de evaluar los cambios histológicos y citológicos neuronales y la reacción glial en la región hipocámpal del cerebro, analizamos el cerebro de ratas adultas de los grupos W y C luego de 6 meses de tratamiento. Se evaluó la morfología del área CA1 del hipocampo y se determinó cualitativamente el grado de inmunomarcación de la peroxidasa. Las imágenes representativas para los marcadores de neurodegeneración MAP-2 y pNF H/M se observan en la figuras 3.

La proteína MAP-2 es un componente esencial en la estructura del citoesqueleto del árbol dendrítico y en el mantenimiento de la estabilidad morfológica de este. En el caso de los animales tratados con bebida cola se observó un incremento en la expresión de esta proteína en el grupo C respecto del grupo W (Fig. 3 a, b).

Los neurofilamentos (NF) son estructuras claves en la formación del citoesqueleto neuronal y del neuropilo circundante. Los neurofilamentos que por su organización bioquímica son filamentos intermedios se encuentran concentrados en el axón permitiendo la preservación de su estructura fundamental para la conformación de la sinapsis (29,30). En muchas patologías neurodegenerativas se encuentran acumuladas de manera anormal.

En hipocampo se puede observar una acumulación de la forma fosforilada pNF H/M en el citoplasma neuronal (Fig. 3c, d). Estas estructuras también presentaron una

inmunomarcación positiva en algunos axones del área CA-1. A nivel cualitativo no se registraron diferencias entre los grupos W y C (Fig. 3c, d).



**Figura 3: micrografía del hipocampo en ratas de los grupos W (a,c) y C (b,d), inmunomarcación para las proteínas MAP-2 (a,b) y pNF H/M (c,d). Se observa a distintos aumentos las zonas analizadas**

Se analizó el área reactiva para cuantificar el grado de positividad para el marcador MAP-2. Para ello se realizaron al menos 50 mediciones en cada fotografía (5 fotografías por hipocampo) (Fig. 3). Además, el estudio de la morfología de los astrocitos mediante inmunotinción mostró un aumento del área positiva para MAP-2 ( $p < 0,05$ , Fig. 3).

## DISCUSIÓN

El consumo de bebida cola por 5 meses resultó en una tendencia al incremento de peso y un aumento el consumo de bebida registrada respecto al grupo agua (W).

En estudios previos, un aumento en el peso corporal junto con hipertensión, un descenso el consumo de comida y un aumento en la ingesta de bebida fue registrado en las ratas expuestas a bebida cola en relación a las ratas que consumieron agua (23, 28, 31) En el presente estudio, por el contrario, no existieron diferencias significativas entre los grupos C y W, aunque se observó una tendencia que se mantuvo durante todo el experimento (Fig. 1).

La proteína MAP-2 constituye un componente estructural del árbol dendrítico proporciona una estabilidad que es conferida a través de la polimerización y la estabilización de los microtúbulos (32). Es común encontrar esta proteína alterada en injurias cerebrales. En diferentes modelos de hipoxia se reporta una disminución en la expresión de esta proteína, haciéndola un marcador bien establecido en el daño degenerativo en el sistema nervioso central (33, 34). En nuestro modelo de síndrome

metabólico con bebida cola, se observó fue un aumento considerable de este marcador, asociado posiblemente a una precipitación de esta proteína, creando una disfunción dendrítica y un trastorno en el transporte. Reportes de una expresión aumentada de MAP-2 se pueden encontrar en el cortex cerebral de pacientes con estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer (35). También, en las células piramidales del córtex cerebral de pacientes con displasia cortical asociada con casos de epilepsia (32). En estos estudios los autores refieren que este incremento puede deberse a una redistribución de MAP-2 desde las áreas invadidas del hipocampo hacia las zonas deservadas del giro dentado (32).

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del neurofilamento pNF H/M en los animales del grupo C respecto del grupo W. Estos neurofilamentos son proteínas altamente abundantes en las neuronas y son encontrados en los axones de todas estas. Su función principal es el mantenimiento del calibre axonal, el cual es esencial para la integridad morfológica y de la velocidad de conducción normal de los impulsos neuronales (36).

En el presente trabajo se registró un aumento del consumo de bebida en animales expuestos a bebida cola respecto a animales expuestos a agua. Luego de 5 meses de tratamiento con bebida coca se observaron cambios en la inmunolocalización del marcador MAP-2 en el hipocampo. La relevancia clínica del aumento del consumo de gaseosas cola requiere de modelos animales que permitan el estudio de parámetros asociados a posibles patologías a corto y mediano plazo. El modelo del presente trabajo puede ser utilizado en otros estudios sobre la patogénesis del síndrome metabólico y sus consecuencias a nivel cerebral.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bovolini, A., Garcia, J., Andrade, M. A. & Duarte, J. A. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int J Sports Med* 42, 199–214 (2021).
2. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, Assi Hl. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 12;23(2):786. doi: 10.3390/ijms23020786. PMID: 35054972; PMCID: PMC8775991.
3. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol.* 2018 Jan-Feb;36(1):14-20. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004. Epub 2017 Sep 8. PMID: 29241747.

4. Govender N, Khaliq OP, Moodley J, Naicker T. Insulin resistance in COVID-19 and diabetes. *Prim Care Diabetes*. 2021 Aug;15(4):629-634. doi: 10.1016/j.pcd.2021.04.004. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33849817; PMCID: PMC8031259.
5. Placzkowska S, Pawlik-Sobecka L, Kokot I, Piwowar A. Indirect insulin resistance detection: Current clinical trends and laboratory limitations. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2019 Sep;163(3):187-199. doi: 10.5507/bp.2019.021. Epub 2019 Jun 4. PMID: 31165793.
6. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*. 2013 Jan;3(1):1-58. doi: 10.1002/cphy.c110062. PMID: 23720280; PMCID: PMC4129661.
7. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):8152-8161. doi: 10.1002/jcp.27603. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30317615.
8. Etchegoyen M, Nobile MH, Baez F, Posesorski B, González J, Lago N, Milei J, Otero-Losada M. Metabolic Syndrome and Neuroprotection. *Front Neurosci*. 2018 Apr 20;12:196. doi: 10.3389/fnins.2018.00196. PMID: 29731703; PMCID: PMC5919958.
9. Hiriart-Urdanivia M, Sánchez-Soto C, Velasco M, Sabido-Barrera J, Ortiz-Huidobro RI. El receptor soluble de insulina y el síndrome metabólico. *Gac Med Mex*. 2019;155(5):541-545. doi: 10.24875/GMM.19005185. PMID: 31695236.
10. Herrera MI, Udovin LD, Toro-Urrego N, Kusnier CF, Luaces JP, Otero-Losada M, Capani F. Neuroprotection Targeting Protein Misfolding on Chronic Cerebral Hypoperfusion in the Context of Metabolic Syndrome. *Front Neurosci*. 2018 May 31;12:339. doi: 10.3389/fnins.2018.00339. PMID: 29904335; PMCID: PMC5990610.
11. Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, Ihara M, Kalaria RN, Horsburgh K. "Chronic cerebral hypoperfusion: A key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia". *Clinical Science*. 131(19) (2017):2451-2468. <https://doi.org/10.1042/CS20160727>
12. Herrera, M. I., Luaces, J. P., Udovin, L. D., Toro-Urrego, N., Otero-Losada, M., & Capani, F. "In Vivo Studies of Protein Misfolding and Neurodegeneration Induced by Metabolic Syndrome Relative to Chronic Cerebral Hypoperfusion: A Critical Review". *Neuroprotection-New Approaches and Prospects*. IntechOpen 2020; (2020): 1-15
13. Yumei, L., Zhang, T., Zhang, X., Zou, W., Gong, X., & Fu, J. (2017). Cinepazide maleate improves cognitive function and protects hippocampal neurons in diabetic rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(3), 249-255
14. Zhang, J., Liu, Y., Zheng, Y., Luo, Y., Du, Y., Zhao, Y., ... & Fu, J. (2020). TREM-2-p38 MAPK signaling regulates neuroinflammation during chronic cerebral hypoperfusion combined with diabetes mellitus. *Journal of Neuroinflammation*, 17, 1-16.
15. Y., Zhang, J., Zhao, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Guan, J., ... & Fu, J. (2021). Curcumin protects against cognitive impairments in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion combined with diabetes mellitus by suppressing neuroinflammation, apoptosis, and pyroptosis. *International Immunopharmacology*, 93, 107422
16. de Artiñano AA, Castro MM. "Experimental rat models to study the metabolic syndrome". *British Journal of Nutrition*.;102(9) (2009):1246-1253. <https://doi.org/10.1017/S0007114509990729>
17. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CT, et al. "Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat." *Nature Genetics*. 13(1) (1996): 18. <https://doi.org/10.1038/ng0596-18>
18. Ahima RS, Flier JS. "Leptin". *Annual Review of Physiology*. ;62(1) (2000): 413- 437. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.413>
19. Picó C, Sánchez J, Oliver P, Palou A. "Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats". *Obesity Research*. 10(9), (2002): 932- 938. <https://doi.org/10.1038/oby.2002.127>
20. Abdel-Megeid FY, Abdelkarem HM, El-Fetouh AM. "Unhealthy nutritional habits in university students are a risk factor for cardiovascular diseases". *Saudi Medical Journal* 32(6) (2011): 621-627
21. Wisløff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernström M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG, Britton SL. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):418-20. doi: 10.1126/science.1108177. PMID: 15662013.
22. Winzell MS, Ahrén B. "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), (2004):S215-S219. [https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl\\_3.S215](https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.S215)

23. Otero-Losada M, Grana DR, Müller A, Ottaviano G, Ambrosio G, Milei J. "Lipid profile and plasma antioxidant status in sweet carbonated beverage-induced metabolic syndrome in rat". *International Journal of Cardiology*. 146(1), (2011):106-109. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.09.066>
24. Otero-Losada M, Mc Loughlin S, Rodríguez-Granillo G, Müller A, Ottaviano G, Moriondo M, et al. "Metabolic disturbances and worsening of atherosclerotic lesions in ApoE<sup>-/-</sup> mice after cola beverages drinking". *Cardiovascular Diabetology*. 12(1), (2013): 57. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-5>
25. Otero-Losada M, Cao G, Mc Loughlin S, Rodríguez-Granillo G, Ottaviano G, Milei J. "Rate of atherosclerosis progression in ApoE<sup>-/-</sup> mice long after discontinuation of cola beverage drinking". *PLoS One*. 9(3), (2014):e89838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089838>
26. Otero-Losada M, Cao G, González J, Muller A, Ottaviano G, Lillig C, et al. "Functional and morphological changes in endocrine pancreas following cola drink consumption in rats". *PLoS One*. 10(3), (2015):e0118700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118700>
27. Otero-Losada M, Gómez Llambí H, Ottaviano G, Cao G, Müller A, Azzato F, et al. "Cardiorenal involvement in metabolic syndrome induced by cola drinking in rats: Proinflammatory cytokines and impaired antioxidative protection" *Mediators of Inflammation*. (2016) 5613056. <https://doi.org/10.1155/2016/5613056>
28. Otero-Losada M, González J, Müller A, Ottaviano G, Cao G, Azzato F, et al. Exercise ameliorates endocrine pancreas damage induced by chronic cola drinking in rats. *PLoS One*. 2016b;11(5):e0155630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155630>
29. Saraceno GE, Bertolino ML, Galeano P, Romero JJ, García-Segura LM, Capani F. Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia. *Exp Neurol*. 2010 Jun;223(2):615-22. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.02.010. Epub 2010 Mar 3. PMID: 20206165.
30. Cebra E, Capani F, Selvin-Testa A, Funes MR, Coirini H, Loidl CF. Neostriatal cytoskeleton changes following perinatal asphyxia: effect of hypothermia treatment. *Int J Neurosci*. 2006 Jun;116(6):697-714. doi: 10.1080/00207450600674970. PMID: 16753896.
31. Milei J, Otero Losada M, Gómez Llambí H, Grana DR, Suárez D, Azzato F, Ambrosio G. Chronic cola drinking induces metabolic and cardiac alterations in rats. *World J Cardiol*. 2011 Apr 26;3(4):111-6. doi: 10.4330/wjc.v3.i4.111. PMID: 21526048; PMCID: PMC3082734.
32. Hurtado, A. P., Aura, ;, Rengifo, C., Torres-Fernández, O., Hurtado, A. P. ;, Rengifo, A. C. &, Torres-Fernández, O. (2015). Immunohistochemical Overexpression of MAP-2 in the Cerebral Cortex of Rabies-Infected Mice. *International Journal of Morphology*, 33(2), 465–470. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000200010>
33. Herrera, M.I., Udovin, L. D., Toro-Urrego, N., Kusnier, C. F., Luaces, J. P., & Capani, F. (2018). Palmitoylethanolamide ameliorates hippocampal damage and behavioral dysfunction after perinatal asphyxia in the immature rat brain. *Frontiers in Neuroscience*, 12(MAR). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00145>
34. Udovin, L. D. L. D., Kobiec, T., Herrera, M. I. M. I., Toro-Urrego, N., Kusnier, C. F. C. F., Kölliker-Frers, R. A. R. A. R. A., ... Capani, F. (2020). Partial Reversal of Striatal Damage by Palmitoylethanolamide Administration Following Perinatal Asphyxia. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1345. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01345>
35. Mukaetova-Ladinska, E. B., Garcia-Siera, F., Hurt, J., Gertz, H. J., Xuereb, J. H., Hills, R., ... Wischik, C. M. (2000). Staging of cytoskeletal and beta-amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 157(2), 623–636. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64573-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64573-7)
36. Romero, J. I., Holubiec, M. I., Tornatore, T. L., Rivière, S., Hanschmann, E. M., Kölliker- Frers, R. A., ... Capani, F. (2017). Neuronal Damage Induced by Perinatal Asphyxia Is Attenuated by Postinjury Glutaredoxin-2 Administration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 14. <https://doi.org/10.1155/2017/4162465>