



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

**Efecto del consumo crónico de una dieta hipercalórica
sobre la eficiencia mitocondrial del hipocampo y la
corteza cerebral de rata Wistar**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

pQFB KAREN CARRETO MENESES

LUGAR DE REALIZACIÓN:

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA

CO-DIRECTORA:

M.C. DIANA MORONI GONZÁLEZ

MARZO 2023

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. MARCO TEÓRICO	7
1.1 Dietas hipercalóricas.....	8
1.2 Resistencia a insulina y diabetes tipo 2	9
1.3 Papel de la insulina en el cerebro	10
1.4 Resistencia a la insulina cerebral	11
1.5 Estrés oxidativo en el cerebro insulinoresistente.....	13
1.6 Papel de las mitocondrias en las enfermedades metabólicas	17
1.7 Anomalías mitocondriales en el cerebro con resistencia a la insulina	20
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. HIPÓTESIS.....	26
5.1. Hipótesis nula.....	26
5.2. Hipótesis alternativa	26
6.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	27
6.1 Tipo de estudio	27
6.2 Definición del universo	27
6.3 Tamaño de la muestra.....	27
6.4 Tipo de muestreo	27
6.5 Criterios de selección.....	27
6.5.1 Criterios de inclusión.....	27
6.5.2 Criterios de exclusión.....	27
6.5.3 Criterios de eliminación.....	27
7. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	28
8. METODOLOGÍA.....	29
8.1 Modelo animal	29
8.2 Conformación de grupos	29

8.3 Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa	29
8.4 Sacrificio, perfusión y extracción de cerebro	29
8.5 Determinaciones bioquímicas	30
8.6 Cuantificación de proteínas	30
8.7 Cuantificación de ATP	30
8.8 Formación de complejos mitocondriales	30
8.9 Western Blot: PGC-1 α	31
8.10 Análisis Estadístico	31
9. RESULTADOS	32
Caracterización metabólica de los grupos experimentales.....	32
Demostración de la formación de complejos y supercomplejos mitocondriales.	35
Evaluación de la actividad de complejos y supercomplejos mitocondriales	38
Cuantificación de la producción de ATP	42
10. DISCUSIÓN	42
11. CONCLUSIÓN.....	55
12. BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO 1.....	75
ANEXO 2.....	83
ANEXO 3.....	84
ANEXO 4.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
ADNmt	ADN mitocondrial
ALA	Ácido -lipoico
AGE	Productos finales de glicación avanzada
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5- metil 4-isoxazolpropiónico
APAF1	Factor activador de la proteasa apoptótica 1
BHE	Barrera hematoencefálica
CE	Ceramidas
CF	Corteza frontal
CL	Cardiolipina
CT	Corteza temporal
CETP	Proteína de transferencia de éster de colesterol
CRI	Complejos respiratorios individuales
CTE	Cadena de transporte de electrones
CoQ	Coenzima Q
Cyt C	Citocromo C
DAG	Diacilglicerol
DT2	Diabetes tipo 2
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
END	Enfermedades neurodegenerativas
FUNSAUD	Fundación Mexicana para la Salud
ICE	Enzima convertidora de interleucina-1
GABA	γ -ácido aminobutírico
GIP	Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón-1
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado

HCD	Dieta hipercalórica
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Dieta rica en grasas
HP	Hipocampo
IKK	I κ B quinasa
IRS1/2	Sustrato del receptor de insulina tipo 1 y 2
JNK	Cinasa terminal c-Jun
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LTP	Potenciación a largo plazo
LTD	Depresión a largo plazo
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
NAC	N-acetil-L-cisteína
NAD	Dinucleótido de nicotinamida adenina
FAD	Dinucleótido de flavina adenina
NAFLD	Hígado graso no alcohólico
NOX	NADPH oxidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
PGC1- α	Coactivador del receptor gamma del activador del proliferador del peroxisoma
PIB	Producto Interno Bruto
PKB	Proteínas quinasas B
PKC- α	Proteínas quinasas C
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PPAR γ	Agonista del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
REM	Respuesta al estrés mitocondrial
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno

RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RVLM	Médula ventrolateral rostral
SCs	Supercomplejos
sd-LDL	LDL pequeñas y densas
SGLT-2	Cotransportador de sodio-glucosa 2
SMet	Síndrome metabólico
SNC	Sistema nerviosos central
TAB	Tejido adiposo blanco
TAP	Tejido adiposo pardo
TG	Triglicéridos
TOG	Tolerancia oral a la glucosa
UPR	Proteínas de respuesta mal plegadas
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

1. MARCO TEÓRICO

La nutrición es el reflejo de costumbres y tradiciones de una sociedad, la cultura alimentaria es transmitida de generación en generación, lo cual influye en el estado nutricional y, por ende, en la salud de la población (Rodríguez Vázquez, 2012). Sin embargo, paulatinamente la dieta en el humano se ha modificado y adaptado en dependencia de los cambios socioeconómicos a lo largo de su historia (Gómez Delgado & Velázquez Rodríguez, 2019). Particularmente en México, el incremento de la urbanización, la industrialización y las jornadas laborales han traído consecuencias en la forma en que la sociedad distribuye sus alimentos, afectando la calidad y cantidad de nutrimentos en su proceso. Como consecuencia del abastecimiento, la calidad nutricional se ve disminuida y la proporción de macronutrientes es inadecuada para cubrir el requerimiento calórico necesario para llevar a cabo las actividades día a día. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la nutrición es la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo, en este sentido, una mala nutrición altera el desarrollo físico y mental, disminuye la capacidad del organismo para hacer frente a las enfermedades y, por ende, la productividad del individuo (OMS, 1990).

Los principales cambios en la dieta a nivel mundial han sido la incorporación de alimentos altamente procesados, bebidas endulzadas artificialmente, la comida rápida y el marketing masivo alusivo a la alta disponibilidad y accesibilidad de dichos alimentos. Los factores reportados como barreras a la hora de alimentarse saludablemente son: la falta de conocimiento, tiempo y/o dinero para comprar, preparar y/o consumir alimentos saludables, la falta de una alimentación saludable en la familia, la preferencia por consumir bebidas azucaradas y comida densa en energía, la falta de motivación y el desagrado por el sabor de las verduras (Secretaría de Salud, 2019). El consumo de alimentos procesados de manera ocasional no genera un impacto desfavorable, siempre y cuando el 80% de la dieta sea de origen natural y cumpla con las características de una dieta equilibrada y saludable. Sin embargo, cuando el consumo de alimentos procesados es de manera frecuente el organismo genera adaptación y compensación a los altos contenidos calóricos, puesto que los ingredientes con los que están elaborados generan un gran impacto a nivel energético, neuronal, metabólico y hormonal. El

consumo de alimentos procesados altamente apetitosos con alto contenido calórico e inadecuadamente saciantes provoca un desequilibrio entre la ingesta de energía y el gasto energético que deriva en problemas de salud cuya prevalencia actual es elevada como la resistencia a la insulina (RI), y enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2) (Hall et al., 2019; Small & DiFeliceantonio, 2019).

1.1 Dietas hipercalóricas

En la actualidad, las personas se encuentran expuestas a una gran variedad de alimentos procesados, cuyo consumo está influenciado por la mercadotecnia, haciendo que estos sean consumidos de manera frecuente, incorporándolos a su alimentación diaria. Simultáneamente, la falta de educación nutricional sobre cómo manejar porciones de alimentos, el desconocimiento de los beneficios de una alimentación balanceada y los efectos nocivos de una dieta alta en carbohidratos y grasas, conllevan a un sobre consumo de macronutrientes, como se ha mencionado en anteriores estudios, permitiendo el desarrollo de alteraciones metabólicas (Pi-Sunyer, 2000). Cada individuo posee un gasto calórico diario que debe cubrirse con una alimentación equilibrada, cuando se tiende a consumir más calorías de las que se gastan, existe un excedente calórico que se almacena en tejido adiposo como resguardo energético. Una dieta hipercalórica (HCD) se refiere al consumo excesivo de calorías provenientes de un consumo extra principalmente de carbohidratos o grasas. Dichos macronutrientes generan una respuesta metabólica y neuro-hormonal antes, durante y después de su consumo (Ishizuka et al., 1983).

Particularmente, una dieta hipercalórica-hiperglúcida es un tipo de dieta conformada por alimentos altos en carbohidratos como azúcares y harinas refinadas, presentes en alimentos procesados (comida rápida) o de origen natural (frutas, semillas, tubérculos, etc.). En los alimentos procesados, los azucares son añadidos para dar sabor, color, como conservadores o para equilibrar la acidez (Goldfein & Slavin, 2015). Los principales ingredientes de los alimentos procesados altos en azúcares son: harina de trigo, jarabe de maíz de alta fructosa, jarabe de caña, jarabe de malta o de acre, o melaza, los cuales

no tienen ningún beneficio nutricional a diferencia de los carbohidratos saludables como los granos enteros, frutas y verduras, que contienen vitaminas, minerales y fibra (American Heart Association, 2018). El consumo de azúcares refinados como parte de una dieta alta en carbohidratos induce el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. Al inicio, existen compensaciones por parte del hígado y páncreas, hasta que se da inicio a alteraciones metabólicas como mecanismos de protección frente al daño de la alta ingesta energética. Existe evidencia epidemiológica donde se asocia la dieta alta en carbohidratos, diabetes y la aparición de hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) (Yki-Järvinen, 2010). A partir de esta correlación, se considera si la RI predispone a la esteatosis hepática y con ello NAFLD o si la acumulación de lípidos en el hígado promueve la RI (Samuel, 2011).

1.2 Resistencia a insulina y diabetes tipo 2

La insulina es fundamental en la homeostasis de la glucosa, al tener efectos directos sobre tejidos que desempeñan distintas funciones en el equilibrio metabólico, como son: el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo blanco (TAB). Cuando son necesarios niveles más altos de insulina en circulación para llevar a cabo su acción en las células diana, se considera que hay RI (Petersen & Shulman, 2018).

La RI es un complejo desorden metabólico; mecanismos como la acumulación de metabolitos lipídicos ectópicos, la activación de vías de proteínas de respuesta mal plegadas (UPR) y la inmunidad innata están implicados en la patogénesis de la RI (Samuel & Shulman, 2012). La acumulación de lípidos en el músculo esquelético y el hígado es promovida por el consumo de dietas hipercalóricas mientras que en los adipocitos suscita estrés oxidativo e inflamación, resultando en RI (Petersen & Shulman, 2018). Estudios han demostrado que las dietas hipercalóricas conducen no sólo a RI periférica, sino también a RI neuronal (Pipatpiboon et al., 2012). Aunque durante muchos años el cerebro se ha considerado un órgano insensible a la insulina, ahora se sabe que la insulina desempeña un papel fundamental en el sistema nervioso central (SNC) participando en la supervivencia neuronal, la neuroplasticidad, la memoria y las funciones

cognitivas (Arnold et al., 2018; Blázquez et al., 2014; Gray et al., 2014; Nelson et al., 2008). Además, estudios recientes han demostrado que la RI periférica da como resultado la pérdida de la función cerebral, lo que indica una fuerte relación entre las alteraciones metabólicas y la degeneración cerebral, el deterioro cognitivo, la depresión y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Butterfield et al., 2014; Frisardi et al., 2010; Sripetchwandee et al., 2018; Tong & de la Monte, 2009; Whitmer, 2007). Se sugiere que un posible denominador común de todas estas condiciones podría ser el estrés oxidativo crónico. De hecho, en diversas enfermedades sistémicas y genéticas, las alteraciones en los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, así como el aumento de la oxidación de los componentes celulares, son los principales factores que dañan el tejido cerebral y promueven la neurodegeneración (Cobb & Cole, 2015; Federico et al., 2012; Gandhi & Abramov, 2012).

1.3 Papel de la insulina en el cerebro

La insulina, una hormona peptídica anabólica, juega un papel crucial en la regulación de la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo. La mayoría de los receptores de insulina se localizan en los tejidos diana (p. ej., hígado, músculos esqueléticos y tejido adiposo), sin embargo, también se ha reportado su alta densidad celular en el cerebro, principalmente en las áreas encargadas de la regulación de la función cognitiva, el apetito y actividad autonómica (Arnold et al., 2018; Blázquez et al., 2014; Gray et al., 2014; W. Zhao et al., 1999). Curiosamente, la insulina en el cerebro puede originarse no solo a partir de las células pancreáticas, sino que también puede sintetizarse *de novo* en las neuronas y las células gliales (Blázquez et al., 2014; Gray et al., 2014; Schechter et al., 1992). Sin embargo, independientemente del lugar de acción/producción de la insulina, esta hormona ejerce un mecanismo molecular similar tanto en el cerebro como en la periferia (Banks et al., 2012; Kleinridders et al., 2014). Como se ha demostrado en numerosos estudios, la acción de la insulina en el cerebro incluye la regulación de la ingesta de alimentos, el comportamiento alimentario, el peso corporal y la homeostasis energética (Kleinridders et al., 2014; W. Zhao et al., 1999). Estos efectos pueden estar mediados por dos componentes principales de los sistemas de transducción de insulina

del cerebro: la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos/Ras (MAPK/Ras) (Sa-nguanmoo et al., 2016). Sin embargo, algunas de las acciones de la insulina son específicas del SNC.

De hecho, la insulina tiene varias funciones neuronales: proporciona supervivencia neuronal, participa en la plasticidad sináptica y regula el funcionamiento del cerebro, incluida la memoria, la cognición, el aprendizaje y la atención (Stockhorst et al., 2004; Talbot et al., 2012). Se ha demostrado que la insulina puede modular la actividad neuronal a través de varios mecanismos moleculares (Feldman, 2009; I. Song & Haganir, 2002). Esta hormona afecta la densidad del receptor de neurotransmisores, inhibe la noradrenalina y estimula la recaptación de serotonina en las sinapsis del SNC (W.-Q. Zhao & Alkon, 2001). También modula la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) al reducir la cantidad de receptores AMPA (ácido-amino-3-hidroxi-5-metil 4-isoxazolpropiónico) para el glutamato, así como al estimular la translocación de los receptores GABA (γ -ácido aminobutírico) en la membrana postsináptica (Feldman, 2009; I. Song & Haganir, 2002).

1.4 Resistencia a la insulina cerebral

Al cerebro, se le atribuye un papel crucial en la patología de la RI. La RI se define como la ausencia o disminución de la respuesta de los tejidos diana a la insulina (Holloway et al., 2014; Maciejczyk, Matczuk, et al., 2018). A nivel molecular, la RI es causada por una pérdida/regulación a la baja de los receptores de insulina y los sustratos de los receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2), así como por el deterioro de la actividad de unión del receptor de insulina (Holloway et al., 2014; Taylor, 2012). Funcionalmente, la sensibilidad cerebral reducida a la insulina puede manifestarse como alteraciones en el crecimiento de neuritas, neuroplasticidad alterada y alteraciones en la liberación y captación de neurotransmisores (Benedict & Grillo, 2018). Teniendo en cuenta que muchos factores contribuyen al transporte de insulina al cerebro (p. ej., lipotoxicidad, glucotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo), la RI sistémica puede afectar la señalización de la insulina cerebral y provocar un deterioro de la LTD inducida por insulina (Liu et al., 2015; Peng et

al., 2016). De hecho, se ha demostrado que la RI periférica (o nivel elevado de insulina circulante) altera la función de la barrera hematoencefálica (BHE) al reducir el nivel de los receptores de insulina endoteliales y disminuir la permeabilidad de la BHE a la insulina (Arnold et al., 2014; Starr, 2003). Esto da como resultado el deterioro de las funciones fisiológicas de la insulina, así como un aumento de la permeabilidad de la BHE a diversas sustancias (Banks et al., 2012; Kleinridders et al., 2014).

Aunque hasta el día de hoy se han propuesto muchas causas de RI cerebral, la única explicación confirmada es la acumulación de ceramida en el tejido cerebral (S. M. de la Monte et al., 2018; Mencarelli & Martinez–Martinez, 2013). La ceramida, un compuesto del aminoalcohol esfingosina y un ácido graso saturado largo (C:16-C:32), pertenece a un gran grupo de esfingolípidos biológicamente activos que construyen las membranas celulares de las neuronas y las células gliales (Mencarelli & Martinez–Martinez, 2013; Żendzian-Piotrowska et al., 2019). Además de las propiedades estructurales, la ceramida participa en el crecimiento, diferenciación, proliferación y envejecimiento de estas células (He et al., 2010). Sin embargo, también se producen grandes cantidades de este compuesto en el hígado. Se ha demostrado que la RI periférica se asocia con una generación elevada de ceramidas debido al aumento del suministro de ácidos grasos (AG) derivados de una dieta rica en grasas (HFD) (Chavez & Summers, 2012; Haus et al., 2009; Summers, 2006). La ceramida, al igual que otros lípidos neurotóxicos, pasa a través de la BHE, lo que contribuye a la RI del cerebro a través del eje de neurodegeneración hígado-cerebro (S. de la Monte et al., 2012). De hecho, varios estudios han indicado que el aumento de la síntesis de ceramida en el hígado, asociado con la RI inducida por la dieta, también puede mediar la RI cerebral (S. M. de la Monte et al., 2010, 2011, 2018). Así mismo, se ha informado una reducción de la sensibilidad a la insulina en el cerebro confirmada por una disminución de la fosforilación de los receptores/sustratos de insulina, así como la señalización de insulina río abajo (vía PI3K-Akt) después de diferentes períodos de administración de HFD (5-12 semanas) (Cavaliere et al., 2018; Filippi et al., 2017). La diversidad de resultados puede deberse a diversas composiciones de la dieta, así como a la variedad de modelos animales utilizados en los experimentos. Además, la ceramida también se puede producir en el

cerebro (mediante síntesis *de novo* y/o hidrólisis de esfingomielina). De este modo, se ha reportado una síntesis elevada de ceramida neuronal asociada con una señalización alterada de la insulina *in vitro* y en modelos animales de RI, y también en el cerebro de pacientes con RI (S. M. de la Monte et al., 2012; S. M. de la Monte & Tong, 2014).

En el mecanismo molecular, se ha descrito que la inducción de RI cerebral resulta de la fosforilación de IRS-1 mediada por ceramida y la inhibición de la señalización de PI3K-Akt en el cerebro. De manera resumida, la ceramida activa diversas serin-treonin quinasas (p. ej., c-Jun N-terminal quinasas (JNK) e I κ B quinasa (IKK)) capaces de fosforilar la serina y, por lo tanto, inhibe los sustratos de los receptores de insulina, principalmente IRS-1. En consecuencia, la ceramida regula a la baja la fosforilación de Akt y la actividad de la quinasa a través de la inducción de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y activa las proteasas similares a la enzima convertidora de interleucina-1 (ICE), lo que resulta en la interrupción de la vía de señalización de la insulina y la promoción de la apoptosis neuronal (Arboleda et al., 2007; S. M. de la Monte et al., 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que la ceramida altera la viabilidad de las células cerebrales, el metabolismo energético y la actividad mitocondrial y, por lo tanto, puede mediar los déficits neurocognitivos en pacientes con RI. Aunque se ha reportado que principalmente la ceramida de cadena larga (C24-C36) es capaz de inducir RI cerebral, estudios recientes indican que también la ceramida de cadena corta (C2) puede alterar la señalización de insulina en el cerebro (S. M. de la Monte et al., 2010, 2011). Un último efecto es que altos niveles de ceramida suprimen a la proteína Bcl-2 antiapoptótica e inhiben las proteínas quinasas B (PKB) y C (PKC- α) (Ganesan et al., 2010; Morales et al., 2007) y por ende, la apoptosis inducida por ceramidas, al igual que en las enfermedades neurodegenerativas, puede causar complicaciones cerebrales de la RI (Arboleda et al., 2009; Jana et al., 2009).

1.5 Estrés oxidativo en el cerebro insulinoresistente

Los estudios clínicos más recientes han demostrado una fuerte relación entre la RI de todos los tejidos y una mayor incidencia de neurodegeneración, demencia, depresión y

deterioro cognitivo leve (Butterfield et al., 2014; S. M. de la Monte et al., 2018; Frisardi et al., 2010; Tong & de la Monte, 2009; Whitmer, 2007). Aunque algunas de estas anomalías podrían explicarse por hiperglucemia crónica, hiperinsulinemia, dislipidemia y/o inflamación prolongada de todo el organismo, el papel clave se atribuye a la disfunción mitocondrial y al estrés oxidativo cerebral (Choromańska et al., 2017; Rains & Jain, 2011; Tangvarasittichai, 2015). De hecho, el estrés oxidativo es el principal factor patológico responsable de las anomalías metabólicas (p. ej., alteraciones en el metabolismo de la glucosa y los lípidos), así como de la degeneración cerebral, el envejecimiento y la lesión del SNC (Shukla et al., 2011).

En general, el estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), así como la eficiencia de sistemas antioxidantes enzimáticos (p. ej., catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y no enzimático (p. ej., glutatión reducido (GSH), ácido úrico, vitamina C y E) (Borys et al., 2019; Lushchak, 2014). Las anomalías redox a favor de las reacciones oxidativas dan como resultado daño oxidativo, en el que se oxidan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El efecto de las interacciones de los radicales libres puede ser el daño a la membrana celular o las mitocondrias, la acumulación de proteínas oxidadas, así como la formación de mutaciones genéticas en el ADN/ARN (Valko et al., 2007). La alta reactividad de los radicales libres se debe a su vida media muy corta, así como a la capacidad de donar electrones de valencia, que participan en reacciones bioquímicas. Los subproductos resultantes del metabolismo del oxígeno, incluidos los radicales libres recién generados, reaccionan con todas las biomoléculas antes mencionadas (Lushchak, 2014; Valko et al., 2007). Por lo tanto, las consecuencias de la actividad de ROS/RNS pueden ocurrir a distancias considerables del sitio del daño oxidativo primario (Kołodziej et al., 2017). Es bien sabido que los productos de modificación oxidativa pueden alterar el metabolismo y la señalización celular, en particular aumentando la producción de citoquinas proinflamatorias, modificando la expresión génica y promoviendo la muerte celular por apoptosis y necrosis (Lushchak, 2014; Valko et al., 2007).

En condiciones de RI, se han reportado alteraciones en los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, así como un mayor contenido de productos de modificación oxidativa en suero/plasma, además de hígado, músculo, tejido adiposo y tejido cerebral (Champe & Harvey, 1994; Giacco & Brownlee, 2010; Henriksen et al., 2011; Maciejczyk, Żebrowska, et al., 2018; Żukowski et al., 2018). Sin embargo, de todos los órganos del cuerpo, el cerebro es particularmente sensible al ataque de los radicales libres (Cobley et al., 2018; Wang, 2010).

Constituyendo menos del 2% del cuerpo, el cerebro utiliza más del 20% del oxígeno entregado al organismo. Los fosfolípidos de las membranas de las células cerebrales también están enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que, junto con la baja actividad de las enzimas antioxidantes cerebrales y el alto contenido de iones metálicos prooxidantes (por ejemplo, Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Cr^{2+}) hacen al cerebro muy vulnerable al estrés oxidativo (Cobley et al., 2018; Maciejczyk, Żebrowska, et al., 2018; Wang, 2010). Por lo tanto, no sorprende que en el cerebro con RI, la sobreproducción de ROS conduzca al daño oxidativo asociado con una mayor permeabilidad de la membrana celular, agotamiento de ATP y acumulación de agregados de proteínas. Una de las consecuencias perjudiciales de la oxidación de lípidos y proteínas también puede ser la inducción de enzimas proinflamatorias y, por lo tanto, la estimulación de la inflamación cerebral (Pipatpiboon et al., 2012; Verdile et al., 2015). En conjunto, los mecanismos descritos pueden predisponer o inducir neurodegeneración y/o apoptosis neuronal.

Como se demostró en estudios recientes, el aumento de la eficiencia de los antioxidantes cerebrales enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa) y no enzimáticos (ácido úrico) observado en condiciones de RI se debe considerar como una reacción adaptativa en respuesta a una mayor producción de radicales libres (Amin et al., 2011; Baquedano et al., 2016). De hecho, es bien sabido que el fortalecimiento de la barrera antioxidante es el mecanismo protector básico contra la lesión mediada por ROS (Maciejczyk, Szulimowska, et al., 2018). Sin embargo, tales cambios no se han observado en el nivel de glutatión (GSH) cerebral (J. M. Kim et al., 2017; Potukuchi et al., 2018). Complementariamente, se ha informado niveles reducidos

de GSH, con un aumento simultáneo en los niveles de GSSG (glutación oxidado) no solo en el cerebro con IR, sino también en pacientes con EA, enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington (EH) (Aoyama & Nakaki, 2013; Johnson et al., 2012; Koga et al., 2011; Schulz et al., 2000).

Se postula que las alteraciones en el metabolismo del glutación pueden resultar en el deterioro del funcionamiento cerebral tanto en la RI como en las enfermedades neurodegenerativas (Aoyama & Nakaki, 2013; Schulz et al., 2000). Este hecho no es sorprendente porque el GSH es el más importante de los antioxidantes del cerebro (Dringen & Hirrlinger, 2003; Johnson et al., 2012). Este tripéptido, además de las propiedades antioxidantes, también participa en la regeneración de otros captadores de radicales libres (p. ej., vitaminas C y E), regula la expresión génica (incluidas las proteínas de señalización de la insulina), mantiene los grupos sulfhidrilo (-SH) en estado reducido, así como afecta la proliferación, diferenciación y apoptosis neuronal (Aoyama & Nakaki, 2013; Dringen & Hirrlinger, 2003; Johnson et al., 2012; Koga et al., 2011; Żebrowska-Gamdzik et al., 2018). Sin embargo, también los productos finales de glicación avanzada (AGE), productos de glicación y oxidación por azúcares reductores, son un vínculo importante entre la RI y la degeneración cerebral (Cutler et al., 2004; Münch et al., 1998; Ott et al., 2014).

Se ha demostrado también, que la acumulación de agregados proteicos conduce a cambios morfológicos en el tejido cerebral y aumenta la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (F. Song et al., 2014; Srikanth et al., 2011; Yamagishi, 2018). Además, se ha demostrado que los AGE pueden aumentar la producción de radicales libres al inducir la actividad de la NADPH oxidasa (NOX), que es la principal fuente de ROS en las neuronas y las células gliales (Ott et al., 2014; Qin et al., 2013; Wautier et al., 2001). De hecho, el mayor contenido de AGE se demostró en pacientes con RI y enfermedades neurodegenerativas, especialmente en condiciones de hiperglucemia (Juraneck et al., 2015; ZHANG et al., 2005). Sin embargo, diferentes estructuras cerebrales se caracterizan por una variada sensibilidad al desequilibrio redox y al estrés oxidativo. Como se ha demostrado en estudios recientes, la corteza cerebral

de las ratas con RI se ve más afectada por el estrés oxidativo que el hipotálamo (Maciejczyk, Żebrowska, et al., 2018; Verdile et al., 2015). La respuesta diferente de las estructuras cerebrales puede deberse a cambios en la bioenergética mitocondrial, así como a la capacidad distintiva de acumular iones metálicos prooxidantes (principalmente Fe^{2+} y Cu^{2+}) (Kaur et al., 2007; Villa et al., 2012).

En las neuronas, las mitocondrias desempeñan un papel importante en la neurotransmisión y la homeostasis de calcio; además, a través de la fosforilación oxidativa son las encargadas de la producción de ATP, sin embargo, la interrupción de la cadena de transporte de electrones puede conducir a una disminución del ATP, con una mayor producción de ROS (Pipatpiboon et al., 2012). Se ha demostrado que la RI desregula tanto el metabolismo de la glucosa como el de los lípidos y disminuye la actividad de la fosforilación oxidativa aumentando la producción de ROS, estos hallazgos sugieren que la RI puede correlacionarse con la disfunción de las mitocondrias (Pipatpiboon et al., 2012).

1.6 Papel de las mitocondrias en las enfermedades metabólicas

Las mitocondrias son organelos dinámicos con una estructura de doble membrana; la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI), separadas por el espacio intermembrana. Poseen un papel clave en las células, al ser las encargadas de producir ATP, primordial para llevar a cabo los procesos celulares, también están involucradas en la regulación intracelular de Ca^{2+} , la producción y eliminación de ROS, la regulación de la muerte celular apoptótica y la activación de las caspasas (Bhatti et al., 2017). La síntesis de ATP se realiza a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) mediante la oxidación de metabolitos, como la glucosa y los AG a través del ciclo del ácido cítrico y la beta oxidación, respectivamente. Estos metabolitos entran a la célula a través de sus transportadores de membrana, posteriormente los AG pueden convertirse en especies lipídicas consideradas “activas” como diacilglicerol (DAG) y ceramidas (CE) o bien “inertes” como triglicéridos (TG) así como transportarse a las mitocondrias para su oxidación a Acetil CoA (Montgomery & Turner, 2015).

La oxidación de los metabolitos libera a los electrones en los enlaces químicos, como electrones de alta energía para ser capturados por el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) y el dinucleótido de flavina adenina (FAD), que a continuación se reducirán a NADH y FADH₂ (Montgomery & Turner, 2015). Las moléculas de NADH y FADH₂ donan los electrones de alta energía a la cadena de transporte de electrones (CTE), que consiste en complejos del I al IV y se encuentra en las crestas de la MMI (Montgomery & Turner, 2015). Los complejos I (NADH ubiquinona reductasa) y II (Succinato deshidrogenasa) reciben electrones de NADH y FADH₂ respectivamente, en seguida los complejos I y II donan electrones a la coenzima Q (CoQ), el complejo III (Ubiquinol-citocromo C reductasa) acepta el electrón de la CoQ y reduce el citocromo C (Cyt-C), que es parte del complejo III (Ubiquinol-citocromo c reductasa), el Cyt-C es oxidado por el complejo IV (Citocromo C oxidasa) y finalmente los electrones pasan al oxígeno por el complejo IV formando agua (Montgomery & Turner, 2015).

Con el movimiento de electrones a lo largo de la cadena, se libera energía que es utilizada para bombear protones en los complejos, I, III y IV desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana creando un gradiente de protones utilizado por el complejo V (ATP sintasa) para generar ATP a partir de ADP (Montgomery & Turner, 2015). Se han propuesto tres modelos para explicar la organización de los complejos respiratorios en la membrana mitocondrial. El modelo fluido sostiene que todos los componentes redox pueden difundir sin restricciones, fue aceptado hasta 2001 cuando se propuso el modelo sólido, que establece que los complejos respiratorios establecen interacciones para formar estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos (SCs) formadas por dos unidades del complejo III y un número variable del complejo IV en presencia o no de un complejo I, (I-III₂-IV₁₋₂; I-III₂; III₂-IV₁₋₂), o incluso un megacomplejo donde se unen dos unidades del complejo I, III y IV (I₂-III₂-IV₂) (Novack et al., 2020).

La última propuesta es una integración de los dos modelos mencionados anteriormente, llamado el modelo de plasticidad, el cual establece que los complejos respiratorios están presentes en ambas conformaciones, los SCs al igual que los elementos individuales

libres pueden realizar sus acciones, sin embargo, los SCs son más eficientes en la producción de energía con una tasa de formación de ROS más baja (Novack et al., 2020). Las mitocondrias desempeñan un papel clave como reguladores de la homeostasis de la energía celular, pero también son una fuente importante de ROS e inducción de apoptosis celular. De hecho, un estado mitocondrial alterado se ha relacionado con la patogénesis de varios trastornos metabólicos y especialmente trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, como la obesidad, la diabetes tipo 2 y otras comorbilidades que comprenden el síndrome metabólico (Peinado et al., 2014).

El principal regulador del control de calidad mitocondrial y el metabolismo energético es el coactivador del receptor gamma del activador del proliferador del peroxisoma (PGC-1 α). Su actividad es modulada por dos sensores metabólicos, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y SIRT1 a través de la fosforilación y la desacetilación, respectivamente sin embargo, la actividad de PGC-1 α no es constante y puede ajustarse en respuesta a diferentes estados metabólicos (Cantó & Auwerx, 2009).

PGC-1 α se expresa principalmente en tejidos con alta capacidad oxidativa, como el corazón, el músculo esquelético, el hígado, el tejido adiposo pardo y el cerebro, y se induce en gran medida en condiciones que requieren energía, como el frío, el ayuno y el ejercicio (Cantó & Auwerx, 2009). Se han informado niveles reducidos de PGC-1 α en el músculo esquelético de pacientes con concentraciones elevadas de ácidos grasos libres (AGL) en plasma (Richardson et al., 2005) resistentes a insulina y con DT2 (Patti et al., 2003). La expresión de PGC-1 α también se reduce con el envejecimiento, lo que brinda una posible explicación del vínculo entre el envejecimiento y una mayor susceptibilidad a desarrollar DT2 (Ling et al., 2004).

Además, se ha observado que PGC-1 α parece ser un factor clave para mantener la supervivencia neuronal y la transmisión sináptica (Panes et al., 2022). De hecho, la regulación a la baja de PGC-1 α en diferentes áreas del cerebro (hipocampo, sustancia negra, corteza, cuerpo estriado y médula espinal) que ocurre en función del daño neurológico, incluido el estrés oxidativo, la pérdida neuronal y los trastornos motores, se

ha observado en varios modelos animales y celulares. de enfermedades neurodegenerativas (Panes et al., 2022).

En este sentido, se ha demostrado que individuos con RI presentan disminución de la actividad mitocondrial, y por lo tanto en la síntesis de ATP, daño estructural y disminución del contenido total de mitocondrias del músculo esquelético (Petersen & Shulman, 2018). Esta disminución de la actividad mitocondrial podría alterar significativamente la demanda calórica de todo el cuerpo, facilitando el suministro excesivo de nutrientes intracelulares y la RI inducida por lípidos (Petersen & Shulman, 2018). Sin embargo, la relación entre la actividad mitocondrial y la acción de la insulina es bastante compleja y se ha estudiado principalmente en músculo esquelético, hígado, TAB, corazón y tejido adiposo pardo (TAP).

1.7 Anomalías mitocondriales en el cerebro con resistencia a la insulina

Las mitocondrias juegan un papel vital en la homeostasis energética de la célula. Además de los procesos bioenergéticos, también participan en la señalización de la insulina, el control de la muerte/supervivencia celular y son el sitio principal de generación de ROS en la célula, durante las reacciones respiratorias en la CTE. Por lo tanto, no sorprende que las anomalías mitocondriales estén muy relacionadas con el desarrollo de RI periférica (J. Kim et al., 2008; Montgomery & Turner, 2015; Szendroedi et al., 2012). Es bien sabido que en pacientes con RI/obesidad, el suministro excesivo de glucosa y ácidos grasos contribuyen a la mayor formación de ROS mitocondriales (mROS) producidos como subproductos de CTE (Cheng et al., 2010; Martin & McGee, 2014; Montgomery & Turner, 2015).

En estas condiciones, cantidades particularmente grandes de anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) solo oxidan los componentes celulares, pero también inhiben la actividad de las enzimas glucolíticas (Montgomery & Turner, 2015). Además, los resultados de estudios recientes indican un papel fundamental de la disfunción mitocondrial también en la RI del cerebro (Koliaki & Roden, 2016). De hecho, se ha descrito *in vitro* y en modelos animales de RI,

una disminución de la actividad del CTE cerebral, reducción de la respiración mitocondrial, mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt), así como alteraciones en la fusión y fisión mitocondrial (Koliaki & Roden, 2016; Raza et al., 2015). Esto da como resultado no solo una reducción de la síntesis de ATP, del consumo de O₂ y de la generación de CO₂, sino también una sobreproducción de mROS y un desequilibrio redox asociado (Porter et al., 2012; Raza et al., 2015; Wang et al., 2015).

Además, se ha descrito que, en el cerebro con RI, los niveles incrementados de mROS conducen a la apoptosis neuronal, así como una mayor expresión de proteínas proapoptóticas (Bax, Bad, Bak), niveles más bajos de Bcl-2 antiapoptótico, así como activación de señalización de caspasas (Koliaki & Roden, 2016). De hecho, se ha demostrado que el Cyt-C se libera después de la inflamación mitocondrial y forma el complejo con APAF1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1), que estimula las cascadas de caspasa en el cerebro (Sa-nguanmoo et al., 2016; Sripetchwandee et al., 2018).

Varios estudios relatan que, la sobreproducción de mROS aumenta la acumulación de péptidos A β amiloides e induce daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en el cerebro con RI (Baek et al., 2017; Dragicevic et al., 2010). Curiosamente, también la disminución de la densidad de la columna dendrítica y los procesos LTP se relacionaron con las anomalías mitocondriales en el cerebro insulinoresistente (Chunchai et al., 2016; Kothari et al., 2017; Sun et al., 2016). Por lo tanto, el desequilibrio en la dinámica mitocondrial y el mal funcionamiento de las mitocondrias cerebrales pueden ser responsables, al menos en parte, tanto de las alteraciones en la apoptosis neuronal como de la plasticidad sináptica, el deterioro cognitivo y la degeneración cerebral en el cerebro insulinoresistente (Baek et al., 2017; Chunchai et al., 2016; Dragicevic et al., 2010).

En el modelo animal de la enfermedad de Alzheimer, las anomalías mitocondriales y el depósito de péptidos A β dependen de un grado de deterioro cognitivo en ratones transgénicos con EA (Dragicevic et al., 2010). También se postula una relación similar en el cerebro insulinoresistente. Asimismo se ha demostrado que el tratamiento

farmacológico como los fármacos antidiabéticos (p. ej., biguanida, agonista del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT-2), la terapia hormonal (p. ej. péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) y polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), y la suplementación con antioxidantes (p. ej. N-acetil-L-cisteína (NAC), ácido -lipoico (ALA)) podrían mejorar no solo los parámetros metabólicos del individuo, sino también la sensibilidad a la insulina y la función mitocondrial en cerebro (Palleria et al., 2016; Pintana et al., 2016). También se observaron beneficios similares en pacientes con EA (Feng & Wang, 2012; Mecocci & Polidori, 2012; Morley et al., 2018). Sin embargo, solo unos pocos informes indican que el daño mitocondrial neuronal está asociado con vías de señalización de insulina alteradas (p. ej., AMPK-Akt) y, por lo tanto, con la inducción de RI cerebral. De hecho, no hay pruebas convincentes de que la disfunción mitocondrial predisponga a la inducción de la Ri cerebral y, por lo tanto, se necesita más investigación para lograr una mejor comprensión de la patogénesis.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Un balance energético positivo derivado de la sobre ingesta de dietas hipercalóricas y/o un gasto energético reducido debido a un estilo de vida sedentario tiene un gran impacto en la salud mundial, al promover el desarrollo de RI, síndrome metabólico (SMet) y patologías como la obesidad y la diabetes. De acuerdo con un estudio publicado por el Foro Económico Mundial, las pérdidas a escala mundial por la diabetes han sido alrededor de 500 000 millones de dólares en 2010, y se espera que aumente a 745 000 millones de dólares en 2030 (Bloom et al., 2011). Mientras que la Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD) estima que la carga económica de la diabetes tipo 2 en México fue de 362.8 mil millones de pesos en 2013, lo equivalente al 2.25% del Producto Interno Bruto (PIB) (Barraza-Lloréns et al., 2015).

En este sentido, estas patologías se han convertido en un reto, no solo por las repercusiones en la calidad de vida de los pacientes, sino también por las importantes pérdidas económicas, tanto para las personas que las padecen como para los sistemas de salud (Secretaria de Salud, 2018). Aunado a esto, se ha descrito que la obesidad, el SMet, la diabetes tipo 2 y las comorbilidades comparten una anomalía metabólica común, la RI, que está íntimamente relacionada con la disfunción mitocondrial (Gancheva et al., 2018; S. K. Jha et al., 2017). Recientes estudios han confirmado que la disfunción mitocondrial está involucrada en el inicio temprano de enfermedades neurodegenerativas (END) incluida la EA, EP, y EH (Carmo et al., 2018; C. Chen et al., 2019; S. K. Jha et al., 2017).

La EA es el tipo de demencia más frecuente, el gasto económico mundial del cuidado de la demencia asciende a 604 millones de dólares y se espera que el número de mexicanos afectados para el 2050 será superior a 3.5 millones, por lo que el impacto en el sistema de salud será severo (Gutiérrez-Robledo & Arrieta-Cruz, 2015). Sin embargo, aún hacen falta estudios que evalúen de manera temprana la existencia de la disfunción mitocondrial originada por la ingesta hipercalórica particularmente en hipocampo y la corteza cerebral para profundizar en la comprensión de los cambios mitocondriales en estas patologías, por lo que se plantea la siguiente pregunta.

¿El consumo crónico de una dieta hipercalórica modifica la eficiencia mitocondrial en el hipocampo y la corteza cerebral de rata Wistar?

3. JUSTIFICACIÓN

Está bien establecido que, la sobrenutrición con alimentos ricos en grasas y alto índice glucémico lleva a un estado inflamatorio y oxidante sostenido en el hipocampo por medio de interacciones entre las poblaciones neuronales y células no neuronales, si bien es un proceso reversible inicialmente concluye en un desacoplamiento entre la ingesta calórica y el gasto energético, promoviendo RI, la sobrealimentación y un continuo aumento de peso (Dionysopoulou et al., 2021; Jais & Brüning, 2017)

La inflamación y el estrés oxidativo no solo afectan al hipotálamo, sino también a tejidos periféricos y a otras regiones del cerebro. Se ha demostrado que una HCD es capaz de inducir una reducción del número de neuronas en la corteza temporal y el hipocampo, debido a la respuesta inflamatoria y al estrés oxidativo (Treviño, Aguilar-Alonso, et al., 2015). Sin embargo, la información acerca de estos procesos es escasa o bien la mayoría de los estudios disponibles se centran en el hipotálamo. Sumado a esto, a pesar de que se ha relacionado a las enfermedades metabólicas con la progresión de END debido a la presencia de cambios celulares como reducción de la función mitocondrial y exacerbación de estrés oxidativo, la información acerca de estos procesos en mitocondrias del hipocampo y la corteza cerebral es aún limitada. Su comprensión podría implicar un avance en la investigación clínica con un posterior desarrollo de terapias para trastornos metabólicos y END inducidos por disfunciones mitocondriales.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo crónico de una dieta hipercalórica alta en carbohidratos sobre la eficiencia mitocondrial del hipocampo y la corteza cerebral de rata Wistar.

4.2. Objetivos específicos

En hipocampo, corteza frontal y temporal de los grupos control y alterado metabólicamente:

- Evidenciar la formación de complejos y supercomplejos mitocondriales.
- Evaluar la función de complejos y supercomplejos mitocondriales
- Cuantificar el contenido de ATP.

5. HIPÓTESIS

5.1. Hipótesis nula

El consumo crónico de una dieta hipercalórica no modifica la eficiencia mitocondrial del hipocampo y la corteza cerebral de rata Wistar.

5.2. Hipótesis alternativa

El consumo crónico de una dieta hipercalórica modifica la eficiencia mitocondrial del hipocampo y la corteza cerebral de rata Wistar

6.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Tipo de estudio

Prospectivo, analítico, observacional, de cohorte, transversal y experimental.

6.2 Definición del universo

10 ratas macho Wistar con un peso inicial de 100 g

6.3 Tamaño de la muestra

10 ratas macho Wistar con un peso inicial de 100 g

6.4 Tipo de muestreo

Aleatorio

6.5 Criterios de selección

6.5.1 Criterios de inclusión

Ratas macho sanas (normotolerancia, normolipémicas y de zoometría dentro de los parámetros referenciados para cada una de las cepas), de 100 g de peso promedio y de entre 3 y 4 semanas de edad.

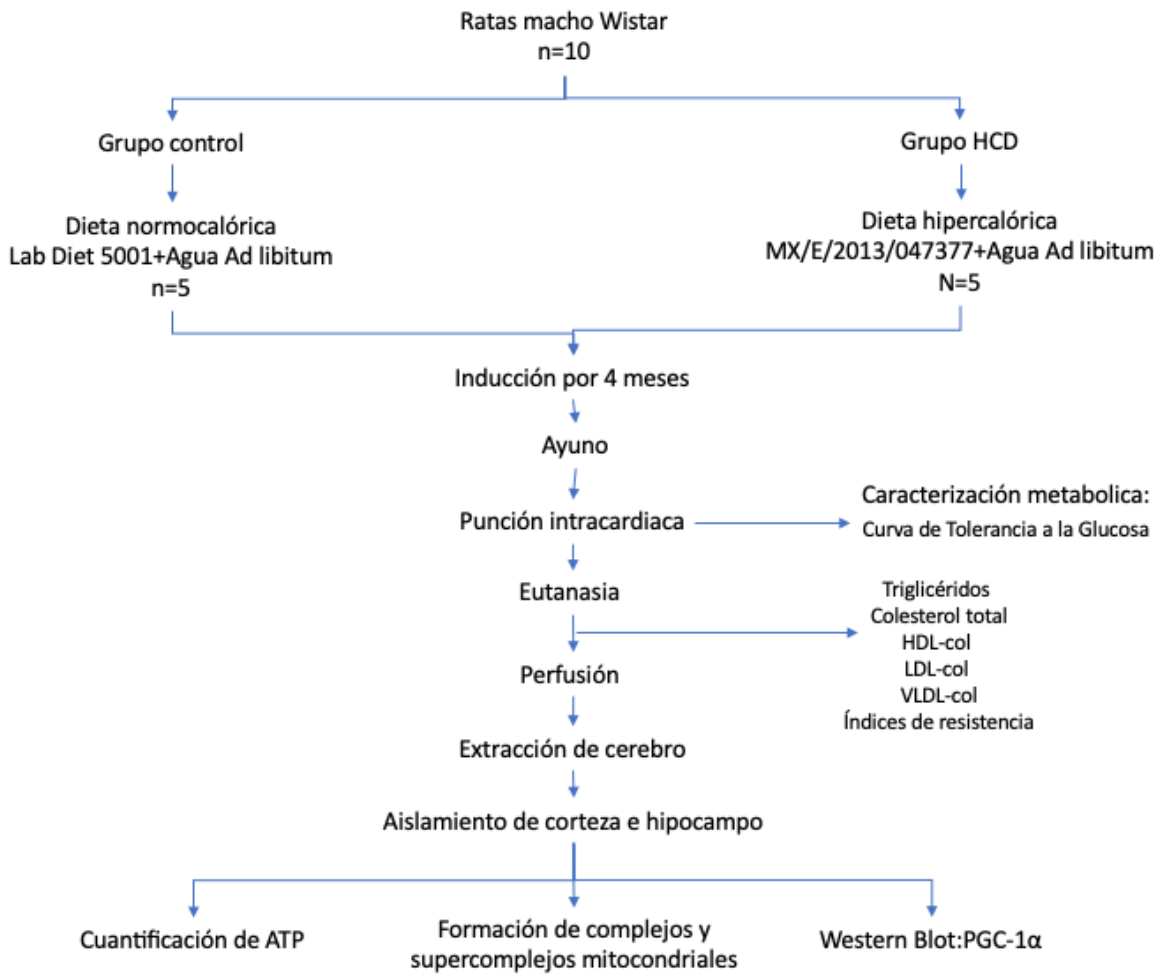
6.5.2 Criterios de exclusión

Ratas macho que presenten alguna enfermedad (hiperglicemias o dislipidemias y de zoometría fuera de los parámetros referenciados para cada una de las cepas) antes del proceso de inducción.

6.5.3 Criterios de eliminación

Ratas macho que presenten alguna malformación física o enfermedades no metabólicas previas o durante el proceso de inducción con la dieta hiperglúcida- hipercalórica.

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. METODOLOGÍA

8.1 Modelo animal

En este estudio se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar, proporcionadas por el bioterio “*Claude Bernard*” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Todos los procedimientos se realizaron bajo las condiciones establecidas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la BUAP y la NOM-062-ZOO-1999, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

8.2 Conformación de grupos

Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos con una n=5 ratas por grupo. El Grupo control (GC) fue alimentado con dieta Lab Diet 5001 y agua de beber *ad libitum* y el Grupo Dieta Hipercalórica (HCD) consumió la dieta MX/E/2013/047377 y agua de beber *ad libitum*. La inducción del modelo fue durante cuatro meses y posteriormente se realizó la caracterización metabólica.

8.3 Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa

Los animales se colocaron en un periodo de ayuno de 4 horas. A continuación, se anestesiaron a las ratas con una dosis de ketamina+xilazina 0.2 ml/100 g vía intraperitoneal y se procedió a realizar una punción intracardiaca. La cual correspondió a la medida de glucosa e insulina basal. Posterior a la toma de muestra al animal se le administro una carga de 1.75 g/kg de peso de glucosa por vía oral y se tomaron muestras sanguíneas a los 30, 60 y 90 minutos posteriores a la administración de la carga de glucosa. En estas muestras se determinó glucosa e insulina para construir las curvas correspondientes.

8.4 Sacrificio, perfusión y extracción de cerebro

Los animales se mantuvieron en ayuno de cuatro horas, se administró pentobarbital sódico a una dosis de 150 mg/kg, por vía intraperitoneal. Después de la eutanasia del animal se realizó la extracción sanguínea para la determinación de triglicéridos,

colesterol total, HDL-col, LDL-col y VLDL-col. A continuación, se realizó la perfusión de los órganos con solución salina isotónica. Posteriormente se decapitaron los animales y se extrajo el cerebro. Se disectaron las regiones de interés, separando hipocampo y corteza, e inmediatamente se resguardaron en ultracongelación a -70°C hasta su análisis.

8.5 Determinaciones bioquímicas

Se realizó la medición de los siguientes parámetros bioquímicos séricos: Glucosa (1001190), triglicéridos (41031), colesterol total (41020), HDL-col (MI1001096), LDL-col (41023), mediante pruebas espectrofotométricas con kits comerciales de la marca Spinreact. La determinación de insulina se realizó mediante una prueba de Elisa también con un kit comercial (ERINS de Thermo Fisher), y se determinaron los índices de resistencia empleando lo reportado por Treviño, Waalkes, et al., 2015 como se indica en el Anexo 1h.

8.6 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford, el cual consiste en la cuantificación de la unión del colorante Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de una proteína estándar. La unión del colorante a la proteína causa un cambio en el máximo de absorción del colorante a 595 nm. Por lo tanto, la cuantificación se realizó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, a 595 nm, y graficando la absorbancia contra la concentración de proteínas.

8.7 Cuantificación de ATP

La cuantificación se realizó con un kit comercial de la casa Abcam, basado en la fosforilación del glicerol para generar un producto que se cuantifica fácilmente mediante métodos colorimétricos (a 570 nm) o fluorométricos (Ex/Em=535/587 nm).

8.8 Formación de complejos mitocondriales

Se utilizó digitonina para solubilizar las membranas mitocondriales de corteza e hipocampo, a continuación, se realizaron corrimientos electroforéticos en condiciones

nativas (Blue-Native Gel), posteriormente se llevó a cabo una transferencia de gel y Western Blot para evaluar la formación de supercomplejos. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: Complejo I: NDUFA9 (ab 14713), Complejo II: SDHA (ab14715), Complejo III: UQCRC2 (ab14745) y Complejo IV: MTCO1 (ab 14705). La actividad de los complejos se evaluó mediante la técnica de actividad de complejos en gel reportada por Fontanesi y Díaz en 2009.

8.9 Western Blot: PGC-1 α

Se realizó el corrimiento electroforético en un gel de acrilamida para electroforesis-SDS al 10% durante 1 h a 120V y a continuación la transferencia húmeda en membrana de PVDF durante 60 minutos a 100V. El anticuerpo primario (ST1202) se utilizó a la concentración 1:1000, se incubó durante 2 horas, posteriormente se realizaron lavados con PBS y se colocó el anticuerpo secundario en una dilución 1:2000 por 1 h, se lavó la membrana y se le colocó luminol reconstituido para posteriormente obtener la imagen correspondiente empleando un fotodocumentador UVITEC y el software Nine Alliance de UVITEC.

8.10 Análisis Estadístico

Los datos fueron recabados y procesados para la obtención de la media, la desviación y el error estándar de la media, además se realizó el análisis estadístico usando la prueba de t-Student para comparar entre el grupo dieta normocalórica y el grupo dieta hipercalórica, considerando un nivel de significancia del 95 % ($P < 0.05$), con ayuda del programa GraphPad Prism.

El análisis del Western Blot y la actividad de complejos se llevó a cabo empleando β -actina o SDHA como proteína constitutiva para normalizar la expresión relativa de cada proteína, posteriormente se realizó un análisis estadístico de t de Student donde una diferencia significativa se considerará con una $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

Caracterización metabólica de los grupos experimentales

Después de someter al grupo HCD al consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 120 días, se analizó la tolerancia a la glucosa y su respuesta insulínica, además de un perfil lipídico de los grupos experimentales con la finalidad de garantizar el modelo de estudio (Figura 1).

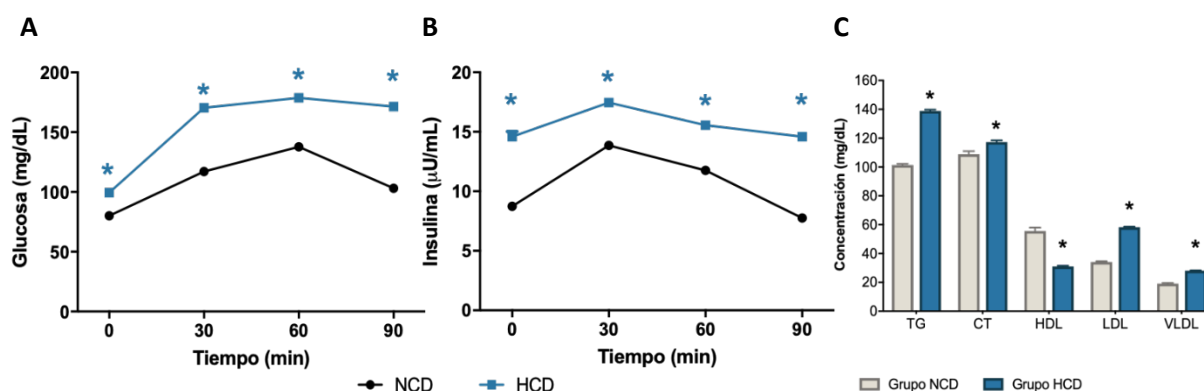


Fig. 1. Análisis metabólico de los grupos experimentales. A) Curva de tolerancia a la glucosa oral; **B)** Niveles de insulina a los 0, 30, 60 y 90 minutos después de una carga de 75 g de glucosa; **C)** Perfil lipídico sérico en condiciones de ayuno. TG, Triglicéridos; TC, Colesterol total; HDL, Colesterol en lipoproteínas de alta densidad; LDL, Colesterol en lipoproteínas de baja densidad; VLDL, Colesterol en lipoproteínas de muy baja densidad. Los resultados mostrados son la media de 10 sujetos experimentales ± el error estándar de la media (EEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba "t" de Student. (*) Indica una diferencia significativa a $p < 0,05$.

En la figura 1A, se observa que el promedio de glucosa en ayuno de para el grupo NCD es de 80 mg/dL, mientras que para el grupo HCD es de 99 mg/dL, lo que corresponde a un aumento del 24%, posterior a la carga de glucosa se observaron a los 30 min promedios de 117 mg/dL para el grupo NCD, y 170 mg/dL para el grupo HCD aumentando 45%. A los 60 min se presentaron promedios para el grupo NCD de 137 mg/dL y 178 mg/dL para el grupo HCD, y finalmente a los 90 min se presentó un aumento de 103 mg/dL para el grupo NCD, y 171 mg/dL en el grupo HCD, lo que correspondió a un incremento del 29% y 66%, respectivamente.

Además, se evaluó la respuesta insulínica en ayuno y postcarga de glucosa. La concentración de insulina en el grupo control correspondió a 8.7 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (0 min), 13.8 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (30 min), 11.7 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (60 min) y 7.7 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (90 min), como se muestra en la figura 1B; mientras que, el grupo HCD mostró un incremento significativo con respecto al grupo NCD en cada uno de los tiempos, de 67%, 25%, 32% y 88% a los 0 min, 30 min, 60 min y 90 min, respectivamente.

Adicionalmente, para determinar si se presentaban alteraciones en la homeostasis de lípidos, se realizó la cuantificación de triglicéridos (TG) colesterol total (CT), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y de muy baja densidad (VLDL) en ayuno, como se muestra en la figura 1C. El grupo control presentó concentraciones promedio de 101 mg/dL para TG, 108 mg/dL para CT, 55 mg/dL para HDL, 34 mg/dL para LDL y 19 mg/dL para VLDL. Al mismo tiempo que, los animales del grupo HCD presentaron un incremento significativo en los niveles de TG (36%), CT (7%), LDL (70%), VLDL (46%), así como una disminución significativa en el colesterol HDL (44%).

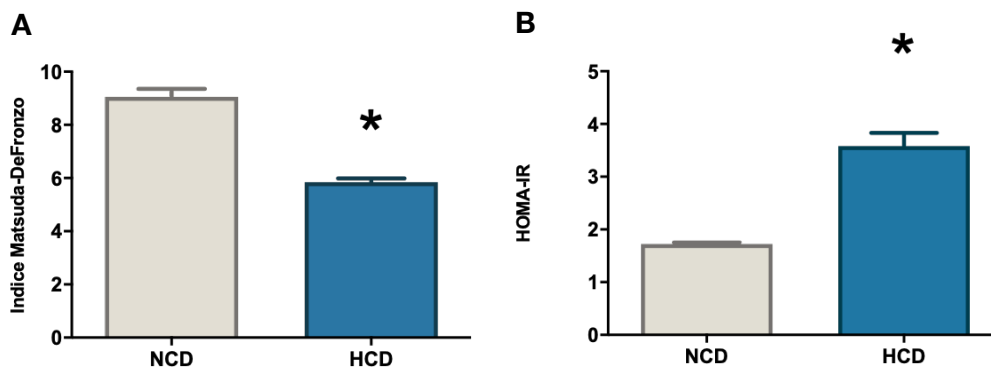


Fig 2. Evaluación de la insulinoresistencia. A) índice Matsuda-DeFronzo de Sensibilidad a insulina post-estimulación, **B)** Índice HOMA-IR para estima la homeostasis basal mediante las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno.

Dadas las alteraciones del metabolismo de glucosa y lípidos, se estableció el estado de resistencia a insulina periférica (Índice Matsuda-DeFronzo) y se calculó el índice HOMA-IR. El acrónimo HOMA-IR representa las siglas en inglés “homeostatic model

assessment” (modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina). La figura 2A denota la disminución en la sensibilidad a la insulina del grupo HCD respecto al grupo NCD, mientras que en la figura 2B se observaron incrementos significativos del 108% en el índice HOMA-IR respecto al grupo NCD, corroborando con esto el desarrollo de resistencia a la insulina en el modelo alimentado con la dieta hipercalórica.

La señalización de insulina es esencial para el correcto funcionamiento neurosináptico, debido a que aumenta el crecimiento de neuritas, promueve la supervivencia neuronal e inhibe la apoptosis, entre otras funciones importantes. Se ha relacionado a la resistencia a insulina con la disfunción mitocondrial lo cual puede tener un vínculo con la regulación de la biogénesis mitocondrial a través de PGC-1 α (coactivador del receptor gamma 1 alfa activado por el proliferador de peroxisomas). En la figura 3A se observa el patrón de expresión de PGC-1 α de los grupos NCD e HCD, en tanto que en la figura 3B se muestra que no hay diferencias significativas con respecto al grupo NCD en las diferentes regiones cerebrales analizadas.

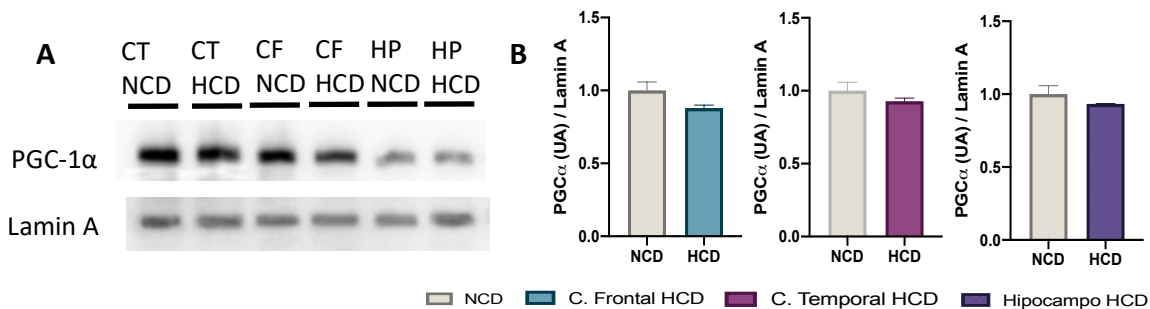


Fig 3. Efecto del HCD en la expresión de PGC-1 α . **A)** Inmunoblot de PGC1a, **B)** Análisis de la relación PGC1a/Lamina A en las diferentes regiones. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba "t" de Student. (*) Indica diferencia significativa a $p < 0,05$.

Las mitocondrias juegan un papel vital en la homeostasis energética de la célula, aunado a esto, se ha demostrado que la disminución de la actividad mitocondrial puede presentarse en individuos con resistencia a insulina. Una manera de analizar la función mitocondrial es mediante el análisis de los SCs mitocondriales, que como describimos

en la introducción se asocian a una mayor eficiencia en la generación de ATP y una menor síntesis de mROS. Por lo que evaluamos la formación de complejos y supercomplejos mitocondriales en el hipocampo y la corteza cerebral.

Demostración de la formación de complejos y supercomplejos mitocondriales.

La figura 4A presenta la distribución de los complejos I, II, III y IV de la corteza frontal (CF), corteza temporal (CT) e hipocampo (HP) de los grupos NCD y HCD, en su forma aislada o asociada en SCs, en la parte superior se puede observar el respirasoma (CI+CIII₂+CIV), seguido por los SCs, CI+CIII₂ y CIII₂+CIV y finalmente los complejos individuales.

Con respecto a la CF, en la figura 4B, se presentan las tres conformaciones diferentes del complejo I. La conformación del respirasoma (I+III₂+IV) no presentó diferencias estadísticamente significativas. Mientras que el SC I+III₂ y el complejo I monomérico incrementaron en 162% y 151%, en el grupo HCD. Es importante también analizar el patrón de ensamblaje en SCs, el cual nos determina que conformación prevalece, si los SCs (cuando el resultado es >1) o bien, los complejos en su forma individual (cuando el resultado es <1). En la figura 5A se presenta la relación CI+CIII₂+CIV/CI, la cual también se ve modificada, ya que el grupo HCD presenta una disminución significativa de 63%, que significa que los complejos están en su forma individual mayoritariamente.

La figura 4C muestra la expresión del complejo III₂ en la CF, en donde se observó un incremento en el grupo HCD tanto del SC I+III₂ como en III₂+IV y III₂ de 85%, 172%, 205%, respectivamente. Mientras que, como se observa en la figura 5B, la relación CI+CIII₂+CIV/CIII₂ disminuyó en el grupo HCD en un 59%, y la relación CI+CIII₂/III₂ decreció en 39%.

El último patrón de expresión analizado para la CF fue el del complejo IV, presentado en la figura 4D. Se observó que tanto el SC CIII₂+CIV como CIV₂ y CIV incrementaron en

48%, 36% y 85%, respectivamente. Mientras que, como se muestra en la figura 5C, se observó una disminución (40%) en la relación $CI+CI_{II_2}+CIV/CIV$.

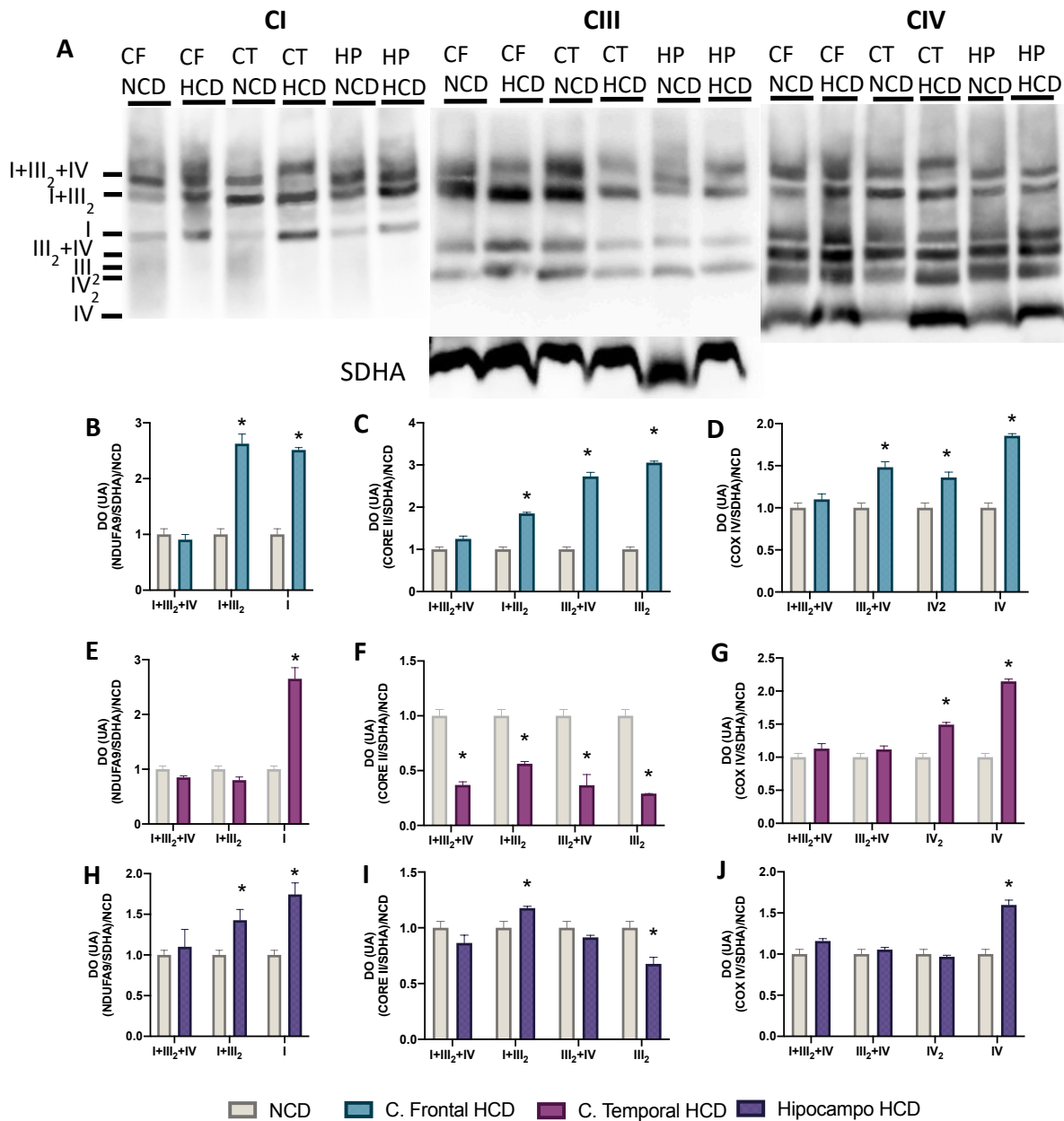


Fig 4. Efecto de HCD en la expresión de complejos y SCs en las diferentes regiones. A) Inmunoblots BNGE mostrando la distribución de CI (NDUFA9), CIII (CORE II), CIV (COX IV) y CII (SDHA) y SCs en los grupos NCD y HCD. Expresión relativa de CI libre y en SCs normalizada a NCD en corteza frontal (B), corteza temporal (E) e hipocampo (H). Expresión relativa de CIII libre y en SCs normalizada a NCD en corteza frontal (C), corteza temporal (F) e hipocampo (I). Expresión relativa de CIV libre y en SCs normalizada a NCD en corteza frontal (D), corteza temporal (G) e hipocampo (J). Los valores presentados

en los gráficos son la media de 3 réplicas por grupo \pm SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba "t" de Student. (*) Indica una diferencia significativa a $p < 0,05$.

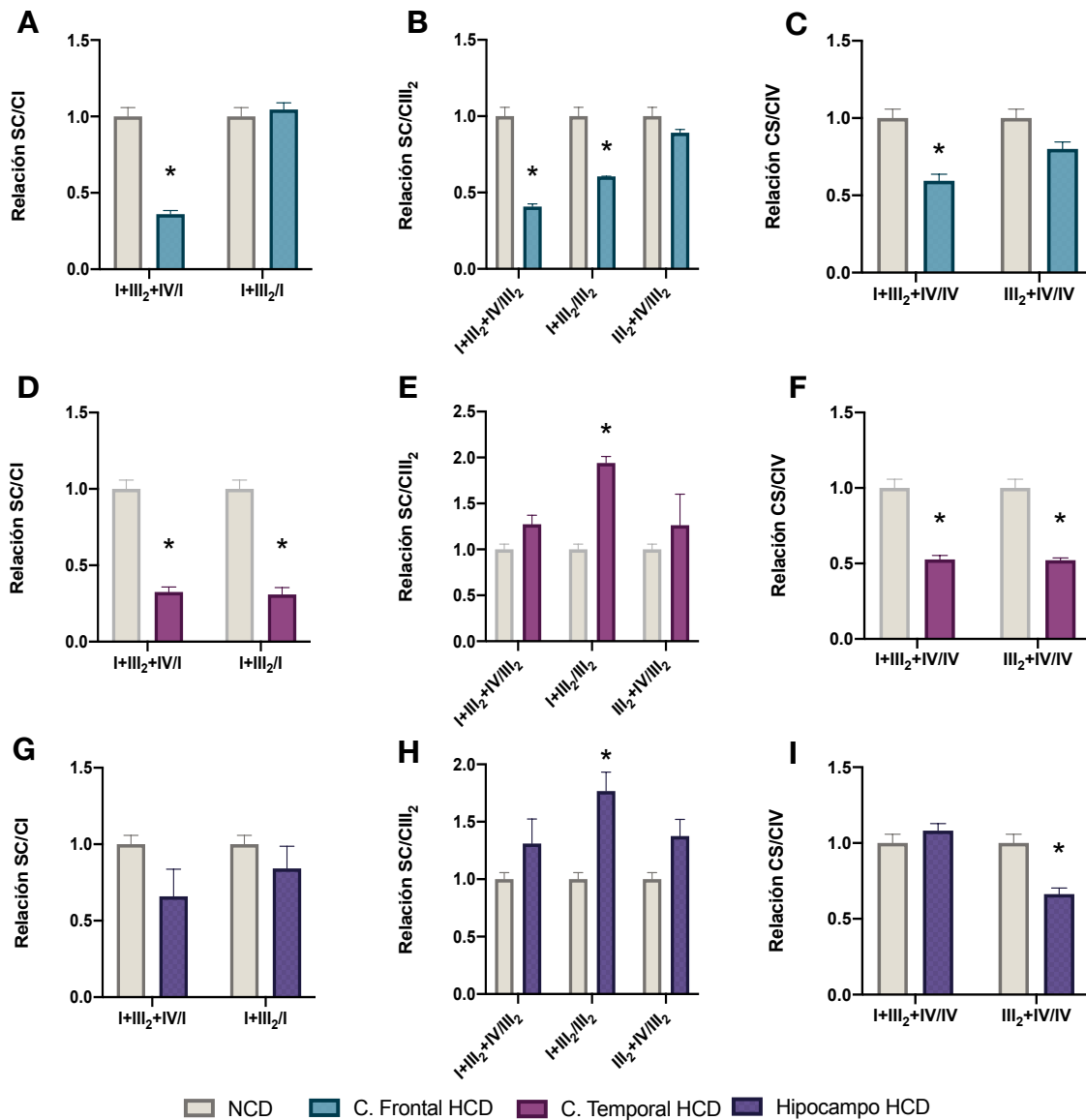


Fig 5. Relación de la expresión de SC/C. Relación de Ci en SC y libre en corteza frontal (A), corteza temporal (D), e hipocampo (G). Relación de CIII en SC y libre en corteza frontal (B), corteza temporal (E), e hipocampo (H). Relación de CIV en SC y libre en corteza frontal (C), corteza temporal (F) e hipocampo (I).

En cuanto a la CT, en la figura 4E se muestra que el CI individual mostró un incremento de 165%. En tanto que, en la figura 5F se observa que el CIII asociado al respirasoma

I+III₂+IV, y a los SC I+III₂ y III₂+IV disminuyeron en un 63%, 43% y 63%, respectivamente. Asimismo, el CIII₂ presentó una disminución de 70%, mientras que en la figura 4G se observa el aumento del CIV (114%) y CIV₂ (49%) con respecto al grupo NCD.

Referente a la relación de la expresión de CI+CIII₂+CIV/CI y CI+CIII₂/CI, en la figura 5D se observa una disminución del 67% y 69%. En cambio, en la figura 5E se observa que la relación CI+CIII₂/CIII₂ incrementó en 94%. En cuanto a las relaciones CI+CIII₂+CIV/CIV y CIII₂+CIV/CIV, se observa que ambas disminuyen en el grupo alimentado con la dieta hipercalórica en 47%, como se observa en la figura 5F.

Respecto al hipocampo, la figura 4H muestra que hay un aumento en la expresión del CI en el SC I+III₂ y del CI individual, que corresponde a un 42% y 74% respectivamente. Mientras que, la figura 4I muestra el aumento de la expresión del CIII asociado al SC I+III (17%) y la disminución del CIII₂ (32%). En la figura 5H, se muestra que la relación CI+CIII₂/CIII₂ aumentó en 76%. Mientras tanto, en la figura 4J el CIV demostró un aumento de 59% en su expresión, a la vez que hay una disminución en la relación CIII₂+CIV/CIV (33%), como se muestra en la figura 5I.

Evaluación de la actividad de complejos y supercomplejos mitocondriales

El inmunoblotting proporciona información sobre el estado de la expresión de complejos individuales y SC mientras que el ensayo de actividad en gel nos permite visualizar y evaluar de manera semicuantitativa si los complejos y SC de la cadena de transporte de electrones son catalíticamente activos.

En la figura 6A se presentan los ensayos de actividad en gel de los complejos I, III y IV después de la electroforesis en condiciones nativas (BNGE) de las diferentes regiones analizadas, presentándose el mismo patrón de corrimiento de los SC y complejos de los inmunoblots, la actividad en gel para el CI se observa en color violeta, CIII en azul y CIV en café.

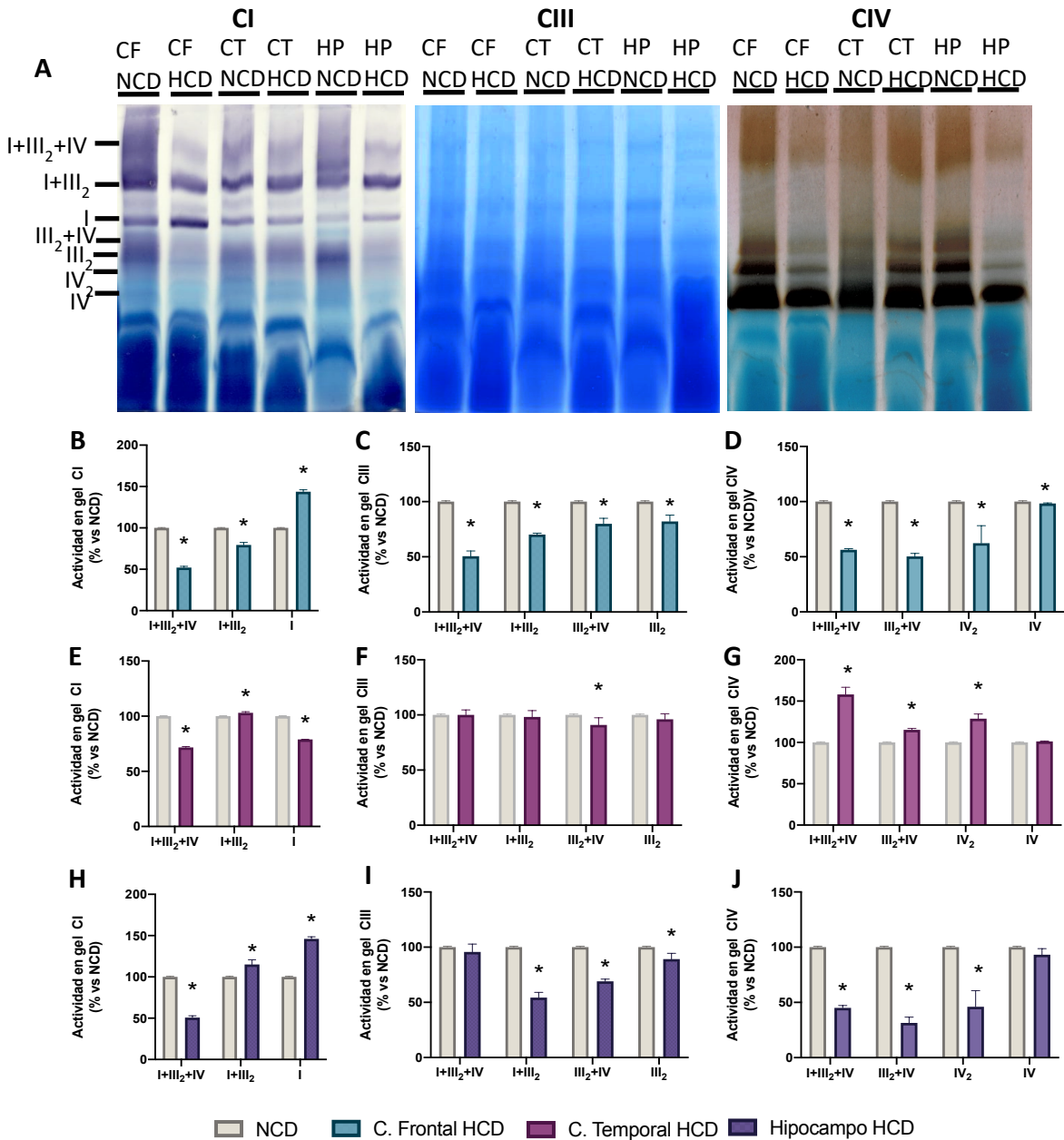


Fig 6. Efecto de la HCD en la actividad de los complejos y SC en diferentes regiones. A) BN-PAGE mostrando la actividad de CI (morado), CIII (azul), CIV (marrón) en NCD y HCD. Porcentaje de actividad en gel de CI y SCs libres normalizado a NCD en corteza frontal (B), corteza temporal (E) e hipocampo (H). Porcentaje de actividad en gel de CIII libre y en SCs normalizado a NCD en corteza frontal (C), corteza temporal (F) e hipocampo (I). Porcentaje de actividad en gel de CIV libre y en SCs normalizado a NCD, en corteza frontal (D), corteza temporal (CT) e hipocampo (J). Los valores presentados en los gráficos son la media de 3 réplicas por grupo \pm SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba "t" de Student. (*) Indica una diferencia significativa a $p < 0,05$.

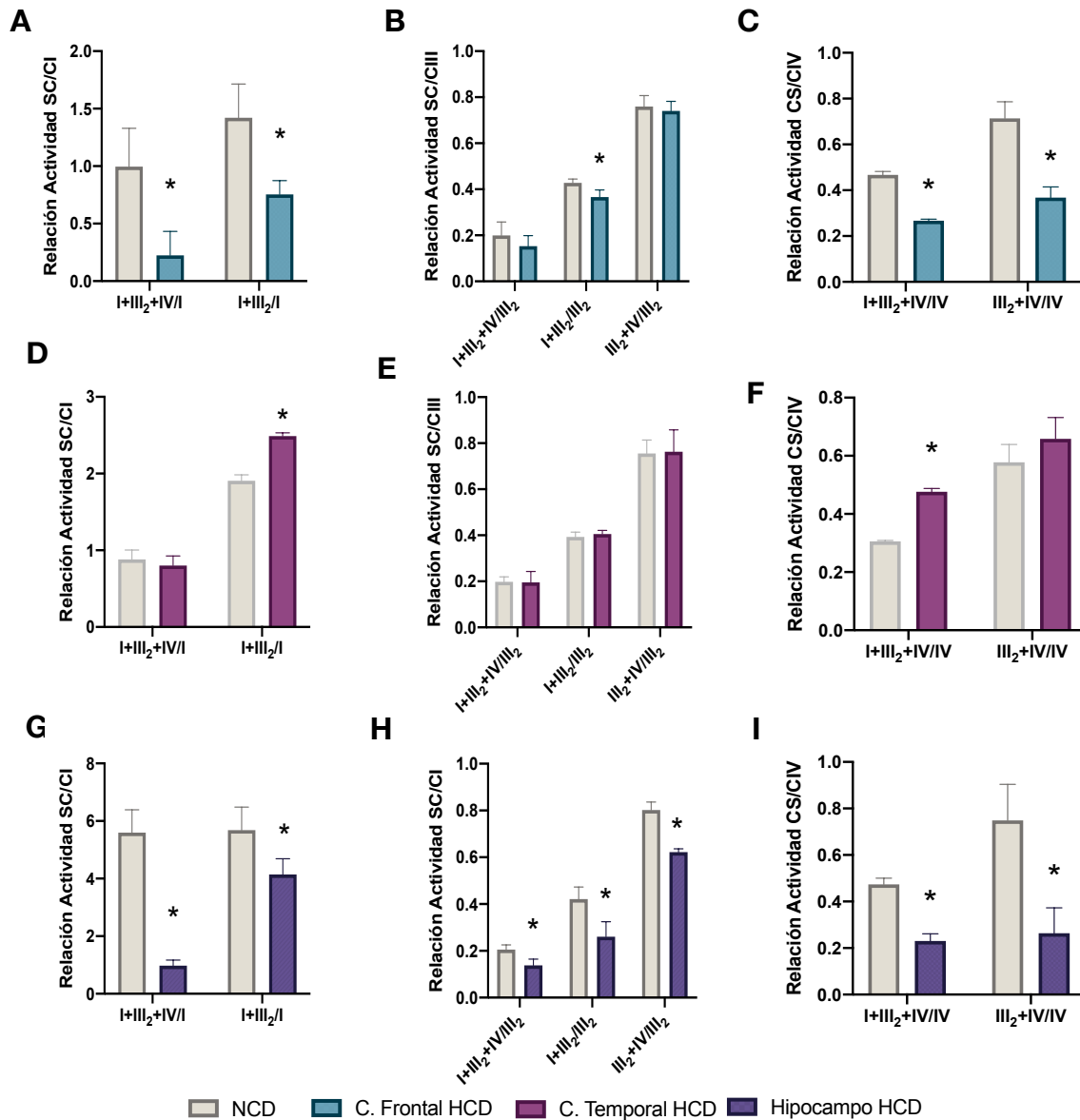


Fig 7. Relación de la actividad en gel de SC/C. Relación de CI en SC y libre en corteza frontal (A), corteza temporal (D), e hipocampo (G). Relación de CIII en SC y libre en corteza frontal (B), corteza temporal (E), e hipocampo (H). Relación de CIV en SC y libre en corteza frontal (C), corteza temporal (F) e hipocampo (I).

Respecto a la CF, en la figura 6B se pone de manifiesto que disminuye la actividad del CI en el respirasoma I+III₂+IV (48%), y en el SC I+III₂ (20%). Por el contrario, se evidenció un incremento de la actividad del complejo I individual (43%), por lo que disminuyó la relación I+III+IV/I (77%) y I+III₂ (46%), lo cual denota una mayor actividad del complejo I

individual vs los SC (Fig. 7A). El CIII (Fig. 6C) disminuyó en las conformaciones I+III₂+IV (49%), I+III₂ (29%) III₂+IV (20%) y III₂ (17%), y también disminuyó su actividad en la relación I+III₂/III₂ (14%). En el caso de CIV, en la figura 6D, se observó también una disminución de la actividad en los SCs I+III₂+IV (43%), III₂+IV (49%), IV₂ (37%) y IV (2%), y en la actividad de las relaciones I+III₂+IV/IV (42%) y III₂+IV/IV (48%).

Adicionalmente, en la figura 6E, se muestra que en la CT del grupo HCD se presentó una disminución de la actividad del CI en la asociación I+III₂+IV (28%) y del CI individual (21%), con un aumento en la actividad de la conformación I+III₂ (3%) y de la relación I+III₂/I en un 30% (Fig. 7D). En el caso del complejo III, únicamente observó diferencias estadísticamente significativas en la actividad en su asociación III₂+IV, disminuyendo en un 9% (Fig. 6F). Contrario a la actividad del CIV (Fig. 6G), la cual aumentó su actividad en la asociación I+III₂+IV (58%), III₂+IV (15%), IV₂ (28%), y la relación I+III₂+IV/IV en un 56% (Fig. 7F).

Finalmente, en el hipocampo del grupo HCD disminuyó la actividad del CI en la conformación I+III₂+IV (49%), mientras se observó un incremento de su actividad en las conformaciones I+III₂ (15%) y CI individual (46%), como se observa en la figura 6H. La relación de la actividad I+III₂+IV/I y I+III₂/I también disminuyó en 82% y 27% (Fig. 7G). En esta región cerebral, la actividad del complejo III decreció en las conformaciones I+III₂ (45%), III₂+IV (30%) y III₂ (10%) (Fig. 6I); lo mismo se observó para la relación entre la actividad de I+III₂+IV (32%), I+III₂ (38%) y III₂+IV (22%) con respecto de III₂ (Fig. 7H). En tanto que, en la figura 6J, se aprecia una disminución de la actividad del complejo IV en las conformaciones I+III₂+IV (54%), III₂+IV (68%), IV₂ (53%) y en la relación I+III₂+IV/IV (51%) y III₂+IV/IV (64%), con respecto al grupo NCD (Fig. 7I).

Cuantificación de ATP

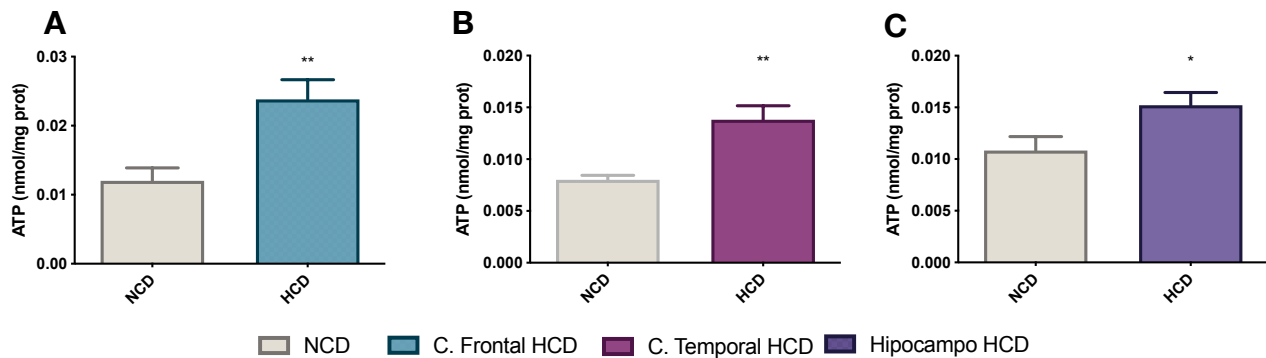


Fig 8. Contenido de ATP en las diferentes regiones. Medición del contenido de trifosfato de adenosina (ATP) en la corteza frontal (A), la corteza temporal (B) y el hipocampo (C) de los grupos experimentales. Los valores presentados son la media de 5 mediciones individuales \pm SEM. (*) Representa una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de control $p < 0,05$ mediante la prueba t de Student.

Finalmente, la cuantificación de ATP en las tres regiones analizadas demostró que hay un incremento tanto en la corteza frontal como en la corteza temporal y el hipocampo que correspondió a un 72%, 98% y 40% respectivamente a comparación del grupo NCD (Fig. 8). Estos resultados derivan de los cambios en la expresión y actividad de los complejos mitocondriales en sus diferentes conformaciones como se analizó en el apartado anterior y que son resultado de las modificaciones bioquímicas en el flujo de macronutrientes a nivel cerebral, debido al consumo crónico de una dieta hipercalórica-hiperglúcida. En nuestro modelo esto se tradujo en un incremento en el contenido de ATP en las diferentes regiones analizadas.

10. DISCUSIÓN

La población con alteraciones metabólicas se encuentra en continuo aumento, y patologías como la obesidad y diabetes se han convertido en retos para el sistema de salud. Es importante indicar que un precedente para el desarrollo de estas patologías es la RI, en la cual se dan alteraciones de la comunicación entre tejidos por metabolitos que actúan como intermediarios (Gancheva et al., 2018). La resistencia a los efectos biológicos de la insulina se ha establecido como una característica distintiva del síndrome metabólico (Roberts et al., 2013). El síndrome metabólico no es considerado por algunos autores como una enfermedad *per se*, sino un término que se utiliza para abarcar la presencia de varios factores de riesgo cardiovascular, como la RI, la dislipidemia aterogénica, la obesidad central y la hipertensión (Fahed et al., 2022).

En pacientes resistentes a la insulina los tejidos diana son incapaces de dar una respuesta biológica normal, la cual implica la supresión de la gluconeogénesis hepática, la supresión de la lipólisis, la captación celular de glucosa y la síntesis de glucógeno (Petersen & Shulman, 2018). Al inicio, en condiciones de RI las células β del páncreas incrementan la secreción de insulina para mantener niveles normales de glucosa en circulación. Dicho evento se ha denominado hiperinsulinemia compensatoria, en consecuencia hay un aumento de los niveles de insulina en plasma en ayunas (Petersen & Shulman, 2018). La combinación de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia compensatoria evita inicialmente el desarrollo de una hiperglucemia, pero aumenta en gran medida el riesgo de padecer algún grado de intolerancia a la glucosa, una concentración elevada de TG y una concentración baja de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Reaven, 2005). Se ha puntualizado que se requieren defectos tanto en los tejidos diana de la insulina como en las células β para el desarrollo de hiperglucemias en ayunas, siendo un indicador tardío (Petersen & Shulman, 2018). Es así como, el desarrollo de RI finalmente se ve evidenciado en alteraciones sobre parámetros séricos, como la concentración de glucosa, insulina y lípidos.

Los resultados de la Fig. 1A muestran que la curva de tolerancia oral a la glucosa (TOG) del grupo NCD tiene un comportamiento clásico, en donde, en una primera fase, del minuto 0 al minuto 60, se presentó la pendiente positiva, mientras que la segunda fase

exhibió la pendiente negativa del minuto 60 al 90. En la curva de tolerancia a la glucosa, están involucradas tanto la secreción como la sensibilidad a la insulina debido a que esta última es responsable de la supresión de la producción de glucosa endógena (Tschritter et al., 2003). La sensibilidad hepática está representada por la primera fase de la curva, mientras que la segunda fase de la curva representa la recaptura de glucosa por los tejidos periféricos, como el músculo.

El grupo NCD evidencia la correcta secreción y eficiencia de la insulina, concluyendo en un eficaz manejo de la glucosa por los tejidos, a diferencia del grupo HCD, en el que se observó un incremento de la concentración de glucosa (Fig. 1A) e insulina (Fig. 1B) en ayunas y post carga de glucosa, con una falta del retorno de la concentración de glucosa entre el minuto 60 y 90 (Fig. 1A). Los resultados sugieren fuertemente que, en la primera fase (pendiente positiva de la TOG), existe un deterioro en el control de la gluconeogénesis hepática y en la segunda fase (pendiente negativa de la TOG) una deficiente recaptura de glucosa por los tejidos periféricos, aun en presencia de hiperinsulinemias constantes (Fig. 1B). Los resultados son consistentes con lo descrito anteriormente por nuestro grupo de trabajo, en donde el empleo de una dieta hiperglúcida por 90 días en ratas Wistar conduce a una franca intolerancia a la glucosa asociada a estados hiperinsulinémicos tanto en ayunas como en el postprandio.

Adicionalmente, la RI en el grupo HCD se corroboró por la diferencia estadísticamente significativa con el grupo NCD de HOMA-IR y el índice Matsuda-DeFronzo (Fig. 2). En donde, asociativamente en el tejido adiposo la RI ocasiona una incorrecta inhibición de la lipólisis que lleva a un aumento de la concentración de AGL en circulación (Fahed et al., 2022). El aumento de AGL plasmáticos conduce eventualmente a la deposición lipídica ectópica y a la lipotoxicidad (Bovolini et al., 2021). La exposición crónica a niveles elevados de AGL es fundamental para el desarrollo de la disfunción celular general del hígado, páncreas y músculo esquelético (Bovolini et al., 2021). Las altas concentraciones de AGL aumentan la síntesis de ésteres de colesterol y TG; y posteriormente, la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ricas en TG, éstas activan a la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), que es la encargada de

transferir TG de las VLDL a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumentando el aclaramiento de HDL a expensas de disminuir su concentración en circulación. Además, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en TG, son hidrolizadas por la lipasa hepática dando lugar a LDL pequeñas y densas (sd-LDL) pobres en colesterol (Fahed et al., 2022).

En nuestros resultados se pudo observar que, las fracciones de colesterol, en el grupo HCD presentan una disminución de HDL, con un incremento de LDL y VLDL. La alteración en las concentraciones de las lipoproteínas aunado al aumento de las concentraciones de TG y colesterol total (Fig. 1C), son características de la dislipidemia metabólica causada por la RI en el SMet. El aumento de AGL empeora la RI al causar cambios en la cascada de señalización de la hormona en diferentes órganos, creando un círculo vicioso (Fahed et al., 2022). En músculo, los AGL alteran la actividad de PI3K asociada a IRS-1, lo que lleva a una disminución de la translocación de GLUT-4 a la superficie y por lo tanto, a una reducción de la captación de glucosa (Fahed et al., 2022). Simultáneamente, la respuesta del hígado a niveles elevados de AGL, y también de otros lípidos plasmáticos como los quilomicrones, las lipoproteínas postprandiales y el colesterol de la dieta, da lugar a una RI hepática y a una acumulación local de lípidos mediada por la desregulación de la gluconeogénesis y el aumento de la lipogénesis hepática *de novo*, conduciendo al estado hiperinsulinémico para mantener los niveles normales de glucosa. Sin embargo, la compensación pancreática finalmente falla, lo que llevará a la disminución de los niveles de insulina, que se verá exacerbada aún más por el efecto lipotóxico de los AGL en las células β , afectando a la síntesis y secreción de insulina debido al estrés oxidativo del retículo endoplásmico y la apoptosis celular (Bovolini et al., 2021; Fahed et al., 2022).

Sin embargo, los trastornos metabólicos que acompañan a la RI no solo alteran el funcionamiento del hígado, el músculo y el tejido adiposo, sino también al cerebro (Maciejczyk et al., 2019). Actualmente se sabe que la insulina juega un papel importante en el SNC, participando en la supervivencia neuronal, la neuroplasticidad, la memoria y funciones cognitivas. Asimismo, recientemente se ha demostrado que la RI periférica

resulta en la pérdida de la función cerebral, denotando una fuerte relación entre los trastornos metabólicos y el deterioro cognitivo, la depresión y la EA (Maciejczyk et al., 2019). Debido a que el cerebro depende altamente del metabolismo de la glucosa y necesita energía en gran medida que utiliza principalmente en la transmisión sináptica, las alteraciones en la utilización o disponibilidad de la glucosa pueden ser causa de la aparición de patologías neurodegenerativas como la EA (Folch et al., 2019).

Aunque algunas de las alteraciones cognitivas relacionadas con la RI, podrían explicarse por hiperglucemia crónica, hiperinsulinemia, dislipidemia y/o inflamación crónica periférica, el papel clave se atribuye a la disfunción mitocondrial y al estrés oxidativo neuronal (Maciejczyk et al., 2019; Pugazhenthii et al., 2017; Sriperchwandee et al., 2018). Los lípidos tóxicos, incluidas las ceramidas de producción hepática que, se liberan a la circulación atraviesan la BHE, y producen un efecto neurodegenerativo al alterar la señalización de la insulina (Galizzi & Di Carlo, 2022). En cerebro las ceramidas inducen estrés oxidativo, estrés del RE, disfunción mitocondrial, peroxidación lipídica, síntesis de nuevas ceramidas e inflamación, mecanismos que conducen a la muerte neuronal (Galizzi & Di Carlo, 2022).

Se ha demostrado que la administración de una HCD durante 90 días induce un deterioro en la memoria espacial, así como una respuesta inflamatoria demostrada por el aumento de IL-1 β , TNF- α y de los astrocitos reactivos, con un incremento del estrés oxidativo debido a las ROS y la peroxidación lipídica, causando una reducción del número de neuronas en la corteza temporal y el hipocampo (Treviño, Aguilar-Alonso, et al., 2015). Asimismo, el modelo de obesidad inducido por una HFD durante 8 semanas se ha asociado con pérdida de sinapsis, incluida la reducción del número de espinas dendríticas corticales y de la expresión de proteínas sinápticas, así como con alteraciones estructurales en la microglia, lo que se relaciona con déficits cognitivos conductuales en la memoria de trabajo y la cognición (Bocarsly et al., 2015).

Concretamente se ha descrito que, la desregulación oxidativa desencadena vías de señalización que promueven la neurodegeneración a través de la inducción de estrés en

orgánulos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico (Folch et al., 2019). Para adaptarse a las distintas condiciones metabólicas las mitocondrias emplean una comunicación mitocondrial-nuclear que induce genes de respuesta al estrés mitocondrial (REM). El control de calidad mitocondrial garantiza los procesos bioenergéticos de la célula para la generación de ATP, la modulación de la biogénesis y la dinámica mitocondrial (Ryan & Hoogenraad, 2007; Schell et al., 2021). La biogénesis mitocondrial está regulada principalmente por PGC-1 α , cuya expresión puede verse alterada por varios factores como el ejercicio, la exposición al frío, las citocinas y la señalización de insulina (Schell et al., 2021).

En un estado diabético la vía de señalización del receptor de insulina se encuentra comprometida. La vía de detección de señalización relevante es AMPK/SIRT/PGC-1 α , relacionada con alteraciones energéticas, el equilibrio intracelular ATP/ADP, el cual adicionalmente está regulado por AMPK, que actúa como un sensor maestro que se activa por niveles elevados de AMP, lo que indica una disminución en la disponibilidad de energía celular que, a su vez, también controla el metabolismo de glucosa y ácidos grasos, así como la biogénesis mitocondrial a través de la actividad de PGC-1 α (Folch et al., 2019; Schell et al., 2021). La activación deficiente de AMPK puede afectar al metabolismo energético, incluida la respiración mitocondrial, la absorción de glucosa, la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo lipídico (Salminen et al., 2011).

Un análisis de la expresión de PGC-1 α y pAMPK en hipocampo fue realizado por Raider et al., (2016) tras la administración de una HFD (60% de grasa, 20% de carbohidratos, 20% de proteínas) durante 5 meses a un modelo murino, sin encontrar cambios estadísticamente significativos entre los grupos. Sobre este punto, Petrov et al., (2015) demostraron que ratones alimentados durante 5 meses con una HFD (45% de grasa, 16% de proteína y 39 % de carbohidratos) presentan una reducción significativa de PGC-1 α en hipocampo. Sin embargo, mencionan que las diferencias fueron bastante modestas en valores numéricos, y pueden o no representar el comportamiento de los objetivos individuales en condiciones experimentales similares. En el presente trabajo se observó que la expresión de PGC-1 α , si bien presenta una disminución en el hipocampo

del grupo HCD, esta no es significativa con respecto al grupo NCD (Fig. 3). Asimismo, estos resultados concuerdan con lo reportado por Baranowski & MacPherson (2018), que analizaron la expresión de PGC-1 α tras el consumo de una HFD (60% kcal de manteca de cerdo) durante 7 semanas a un modelo de ratones adultos macho C57BL6/J, sin encontrar cambios significativos en hipocampo. En cambio, en las muestras de corteza prefrontal encontraron una menor expresión de PGC-1 α . En nuestros resultados observamos una disminución, sin ser significativa tanto en la corteza frontal como en la corteza temporal en los animales alimentados con HCD (Fig. 3). Sin embargo, la información acerca de la expresión de PGC-1 α tras la exposición a una dieta hipercalórica en hipocampo y corteza frontal es limitada, mientras que, en la corteza temporal hasta donde sabemos aún no ha sido reportada. De igual manera, la diferencia en la composición de las dietas y el modelo murino impactan sobre el resultado reportado.

No obstante, se ha informado la expresión reducida de PGC-1 α en el envejecimiento, en diabetes tipo 2 y en condiciones de RI en el músculo esquelético (Ling et al., 2004; Mootha et al., 2003; Richardson et al., 2005). Mientras que, en varios modelos animales y celulares de enfermedades neurodegenerativas se ha observado la regulación a la baja de PGC-1 α en áreas cerebrales como el hipocampo, la corteza, el estriado, la sustancia nigra y la médula espinal, en función del daño neurológico, incluido el estrés oxidativo, la pérdida neuronal y los trastornos motores (Panés et al., 2022).

Por otra parte, en condiciones saludables, el descenso de energía y/o disminución de las tasas metabólicas pueden ser detectadas por AMPK y SIRT1, promoviendo la fosforilación y la desacetilación de PGC-1 α respectivamente (Cantó & Auwerx, 2009; Panés et al., 2022). El aumento de la relación NAD⁺/NADH promueve la activación de SIRT1, mientras que AMPK es activada por el aumento de la relación AMP/ATP (Cantó & Auwerx, 2009; Panés et al., 2022). En situaciones de alta ingesta energética la actividad de AMPK se reduce por los altos niveles de ATP intracelular (Cantó & Auwerx, 2009). La disminución de la relación AMP/ATP no fomenta la activación de AMPK, lo que explicaría la disminución de la expresión de PGC-1 α en el núcleo. Es importante

mencionar que la actividad de PGC-1 α no es constante y está influenciada por diferentes situaciones metabólicas, en respuesta a situaciones de estrés o variaciones en la disponibilidad de nutrientes u oxígeno, en las que las mitocondrias son capaces de reorganizar su morfología interna y la asociación de SCs, que les permitan una mayor síntesis de ATP, si así lo requiere el sistema, sin necesitar incrementar el número de mitocondrias en primera instancia.

Se ha propuesto que la distribución equilibrada entre los complejos respiratorios individuales (CRI) y los SCs es importante para lograr el rendimiento óptimo de la CTE, debido a que el ensamblaje en SCs puede aumentar la eficiencia de la CTE, reduciendo la tasa de producción de ROS (Novack et al., 2020). Por lo tanto, estudiar el patrón de ensamblaje de SCs puede ser relevante para la comprensión de la disfunción mitocondrial en los trastornos metabólicos asociados con la RI y su relación con los trastornos neurodegenerativos.

En mamíferos se ha descrito que la mayor parte del CI (~90%) interactúa con ~40-50% del CIII₂ y con ~20-30% del CIV para formar los SC I+III₂ y I+III₂+IV₁, a este último se pueden añadir monómeros adicionales de CIV formando I+III₂+IV₂, que son estructuras denominadas como respirasomas, ya que contienen todos los componentes necesarios para transferir electrones del NADH al O₂ (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018). Alrededor del 5 al 10% del CIII₂ y del CIV se encuentran en asociación como SC III₂+IV, mientras que, la mayoría del CIII₂ (~50-60%) y del CIV (~70-80%) se encuentran en forma de complejo libre y sólo alrededor del 2 al 8% del CI se encuentra como complejo individual (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018). En cuanto al CII y el CV en condiciones fisiológicas normales no interactúan con los complejos I, III y IV debido a la formación de oligómeros (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018).

Berndtsson et al., (2020) demostraron que la formación de SCs respiratorios reduce la distancia de difusión del citocromo c entre el CIII y el CIV aumentando la eficiencia de la conversión de energía al mejorar el transporte de electrones. Por su parte, Lapuente-Brun et al., (2013) reportaron que los SCs definen dos poblaciones de CoQ, una dedicada

a transferir los electrones que recibe de NADH, la cual interacciona con los SCs que contienen el CI, en tanto que, la otra población se encuentra libre en la membrana mitocondrial para su uso por el CII y otras las enzimas que usan FAD. De esta manera, la distribución de CRI y el ensamblaje en SCs, determina el flujo de electrones a través de la CTE y su eficiencia para la producción de ATP. Asimismo, el ensamblaje de SCs es dinámico y puede verse como un mecanismo a través del cual las células podrían adaptarse a diferentes fuentes de carbono, y ajustar la CTE a sus propias necesidades (Lapiente-Brun et al., 2013). De hecho, se ha propuesto que el tipo de SC predominante puede relacionarse notablemente con la principal vía metabólica presente. Cuando el sustrato respiratorio primordial es la glucosa la relación NADH:FAD es mayor, por lo que, los electrones son introducidos a la fosforilación oxidativa a través del CI, a diferencia del caso de la oxidación de ácidos grasos en cual la relación NADH:FAD es menor, y los electrones ingresan a través FAD y su CoQ asociada (Lapiente-Brun et al., 2013).

Además de las funciones que se le han atribuido a los SCs como la canalización de sustrato y la reducción de ROS, se ha propuesto que juegan un papel en la estabilidad de los complejos individuales (Acín-Pérez et al., 2008; Letts et al., 2019) aunque, los mecanismos precisos del ensamblaje de SCs y su función fisiológica exacta aún no se han aclarado y requieren más estudios (Javadov et al., 2021). Sin embargo, se ha demostrado un vínculo asociativo entre el ensamblaje en SCs, la respiración mitocondrial y ROS mitocondriales (Javadov et al., 2021; Nesci et al., 2021).

Considerando que, las mitocondrias son capaces de utilizar diferentes fuentes de energía según las condiciones fisiológicas y nutricionales, se ha buscado entender lo que sucede en situaciones de alta ingesta energética y la implicación de la disfunción mitocondrial en diferentes patologías. En particular, en condiciones de RI cerebral inducida por una HFD se ha reportado la disminución en la actividad enzimática oxidativa y la función del ciclo del ácido cítrico en el hipotálamo, el hipocampo y la corteza de modelos murinos, afectando negativamente el metabolismo energético, y aumentando el estrés oxidativo (Rueggsegger et al., 2019).

En nuestro modelo, en la corteza frontal del grupo HCD se observó el aumento de la expresión de los complejos I (Fig. 4B), III₂ (Fig. 4C) y IV (Fig. 4D), tanto en su forma libre, como en su asociación en los SCs I+III₂ y III₂+IV; no obstante, la actividad de los complejos respiratorios disminuyó globalmente (Fig. 6 B, C y D) con excepción del CI libre. Es entonces interesante observar que la sobreexpresión de los complejos parece mantener sin cambios la expresión del respirasoma, aun así, su actividad disminuye. No obstante, el CI libre es el único que aumenta su expresión y actividad por lo que es posible que la fosforilación oxidativa sea mantenida preferencialmente a través de este complejo, siendo el NADH el encargado del principal suministro de electrones.

Adicionalmente, observamos que la mayor proporción del CI se encuentra libre y no asociado al respirasoma (Fig. 5A), y su actividad es mayor como complejo libre que en SCs (Fig. 7A), discrepando con lo reportado en condiciones normales, puesto que, como se mencionó anteriormente la mayoría del CI se ensambla con los complejos III₂ y IV para formar SCs (Acín-Pérez et al., 2008; Javadov et al., 2021; SchÄgger, 2001). De manera que, mantener una relación adecuada de SC/C es importante porqué la pérdida del ensamblaje de SCs puede aumentar la producción de ROS por el CI, como lo demostraron Maranzana et al., 2013. Además, otro hallazgo que apoya esta conclusión procede de un estudio de Lopez-Fabuel et al., 2016 en el que se observó que un alto contenido de CI libre se asocia con la elevada producción de mROS, mientras que el CI predominantemente ensamblado en SCs produce sustancialmente menos mROS.

Asimismo, se ha demostrado que las ROS pueden disminuir la actividad del CI y del CIII₂ a través del daño oxidativo de la cardiolipina, que es necesaria para el ensamblaje y funcionamiento de estos complejos enzimáticos (Basu Ball et al., 2018; Paradies et al., 2001, 2002). A este respecto, Petrosillo et al., 2008 encontraron una disminución de la actividad del CI en las mitocondrias cerebrales de ratas Wistar en un modelo de envejecimiento, que podría revertirse mediante la adición exógena de cardiolipina. En nuestro modelo, en general encontramos la disminución de la actividad de los complejos I y III₂ en asociación, en la CF la actividad de los complejos I y III₂ asociados en SCs

disminuyó. Mientras que, en la CT la actividad del CI disminuyó, tanto en asociación con el respirasoma como en complejo individual y el CIII₂. Mismo efecto se observó en su actividad, asociado al SC III₂+IV. En cambio, en el hipocampo, el CI disminuyó su actividad en el respirasoma y el complejo III₂, también como complejo libre, y en los SCs I+III₂ y III₂+IV. De manera similar, la actividad reducida del CI se ha informado en el músculo esquelético de pacientes con DT2 (Kelley et al., 2002), y en las glándulas parótidas y submandibulares de las ratas Wistar alimentadas durante 8 semanas con una HFD (59.8% de grasa).

Por otra parte, el CI en la corteza temporal presentó un aumento de su expresión como complejo libre (Fig. 5D), aunque su actividad disminuyó. Mientras que, la expresión del CIII₂ disminuyó globalmente (Fig. 4F). A diferencia del CIV que se encontró principalmente libre (Fig. 5F), y su actividad aumentó en asociación en SCs y como dímero (Fig. 6G). Curiosamente Diaz et al., 2012 encontraron que ciertas áreas de la corteza son más vulnerables al defecto del CIII, además de presentar un daño grave y temprano por ROS, esta característica no la observaron en su modelo de neuronas de ratón con defectos en el CIV, demostrando cómo los defectos específicos de la cadena respiratoria tienen mecanismos moleculares distintos, lo que puede conducir a patologías distintas. Adicionalmente, se ha descrito que el CIII es necesario para el ensamblaje y estabilidad del CI (Acín-Pérez et al., 2004) pero, como lo menciona Cogliati et al., 2021, esta interacción no parece ser obligatoria para permitir un CI completamente ensamblado y funcional en todos los escenarios fisiológicos.

En nuestro modelo, en la CT observamos que, a pesar de la disminución global de la expresión del CIII₂, la asociación del CI en SCs no se ve modificada y la actividad del CIII₂ solo disminuye en el SC III₂+IV. En contraste con la actividad del CIV que aumenta cuando está asociado en SCs. En este caso, los informes indican que la transferencia de electrones entre el CIII₂ y el CIV dentro de los SCs de mamíferos es más eficiente que entre los complejos III₂ y IV libres (Vercellino & Sazanov, 2021), confirmando así lo postulado por el modelo de plasticidad (Cogliati et al., 2021). Interesantemente, en la CT, la relación de la actividad SC/C se mantiene o aumenta en el caso de los SCs I+III₂/I y

I+III₂+IV/IV indicando que la mayor actividad se lleva en los SCs sugiriendo que el paso de electrones hasta el CV puede ser eficiente culminando en la formación de ATP.

Finalmente, en el hipocampo del grupo HCD se observó un aumento en la expresión del SC I+III₂ (Fig. 4H y 4I) y de los complejos I (Fig. 4H) y IV (Fig. 4J) individuales. Sin embargo, se presentó una disminución de la expresión (Fig. 4I) y de la actividad del CIII₂ libre y asociado en los SCs I+III₂ y III₂+IV (Fig. 6I). Asimismo, la actividad del CIV se encontró disminuida en SCs y como dímero (Fig. 6J). La disminución de la actividad de los complejos I y IV se ha informado en hígados de animales con diabetes inducidos con estreptozotocina y con obesidad alimentados con una HFD durante 15 días (D. Jha & Mitra Mazumder, 2019). Mientras que, la disminución de la actividad de los complejos III₂ y I se ha reportado en modelos de ratas macho Sprague-Dawley alimentadas con una HFD (10% de grasa, 70% de carbohidratos y 20% de proteína) (D. Chen et al., 2018).

Es interesante observar que en el hipocampo todas las relaciones SC/C en cuanto actividad se encuentran disminuidas indicando que la principal actividad se lleva a cabo en los complejos libres (Fig. 7G - I), similar a la corteza frontal. Mientras que, como se mencionó anteriormente en la corteza temporal se mantiene o incluso aumenta la actividad de SC/C. En este sentido, se ha demostrado que las actividades de los complejos I, III y IV se reducen aproximadamente un 25%, 80% y 70%, respectivamente, antes de que se observen cambios importantes en las tasas de consumo de oxígeno y síntesis de ATP (Davey et al., 1998). Asimismo, Telford et al., 2009 determinaron como umbrales de inhibición ~10, ~35 y 50-65% para las actividades de los complejos I, III y IV, respectivamente, antes de que se observaran cambios importantes en las tasas de consumo de oxígeno. Ambos resultados indican que, de los componentes de la cadena de transporte de electrones, el complejo I ejerce un alto nivel de control sobre la bioenergética de las mitocondrias sinápticas, sugiriendo que las deficiencias del CI que están presentes en los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson, son suficientes para comprometer el consumo de oxígeno (Telford et al., 2009).

Notablemente, en nuestro modelo el contenido de ATP en las tres regiones analizadas presentó un aumento estadísticamente significativo, lo cual difiere con lo reportado por Kang et al., 2015, ya que ellos encontraron una disminución de los niveles de ATP en un modelo de ratas Wistar con obesidad inducida por HFD (45 kcal% de grasa) durante 10 semanas; sin embargo, mencionan que sus resultados difieren de los obtenidos con la dieta HFD durante 20 semanas (Abdurrachim et al., 2014) u ocho meses (Sverdlov et al., 2015). Por el contrario, nuestros resultados concuerdan con lo observado por Pini et al., 2021, ya que reportaron un mayor contenido de ATP que atribuyeron a una mayor actividad glicolítica y mitocondrial en preadipocitos de tejido adiposo blanco, de un modelo de ratones C57/BL6JRj sedentarios alimentados con una HFD (60% de calorías procedentes de grasa) durante 10 semanas. Además, Wu et al., 2014, encontraron un aumento significativo en el contenido de ATP tisular en la médula ventrolateral rostral al proporcionar una HFD (alta en fructosa) durante 12 semanas.

De acuerdo con (Cogliati et al., 2021) el ensamblaje de SC optimiza y organiza el flujo de electrones, controla la producción de ROS, modula la actividad de los complejos y confiere ventaja metabólica *in vivo*. En conjunto, los estudios reportados y nuestros resultados parecen indicar que la sobrecarga calórica altera la disponibilidad de sustrato ($FADH_2/NADH$) para las mitocondrias, lo que conduce a una adaptación mitocondrial específica del tipo celular, que contribuye a mantener la producción e incluso la sobreproducción mitocondrial de ATP, esto último concordando con lo reportado por Pini et al., 2021. No obstante, la perturbación en el transporte de electrones podría conducir eventualmente a la disminución de la oxidación del sustrato con la disminución de la producción de ATP, debido al estrés oxidativo. Sin embargo, estamos empezando a entender estos procesos y quedan por responder muchas preguntas críticas. En el futuro, los estudios sobre la dinámica, la regulación y las implicaciones fisiológicas de SC serán fundamentales para comprender el metabolismo y desarrollar estrategias con fines terapéuticos, además, será obligatoria una mejora de las técnicas para rastrear su composición dinámica *in vivo* (Cogliati et al., 2021).

11. CONCLUSIONES

El consumo crónico de una dieta con alto contenido de carbohidratos induce síndrome metabólico en ratas macho de la cepa Wistar.

En etapas tempranas de resistencia a insulina y síndrome metabólico no se modifica la biogénesis mitocondrial en hipocampo, corteza frontal y temporal en ratas macho de la cepa Wistar.

Así mismo, la alteración metabólica observada promueve la expresión y actividad de complejos individuales y no asociados en SCs en el hipocampo y en la corteza frontal.

La corteza temporal de ratas macho de la cepa Wistar con alteración metabólica aumenta la actividad de los SCs sobre los complejos individuales o libres.

Los cambios en la expresión y actividad de los complejos y SCs generados en las diferentes subregiones cerebrales de ratas Wistar con alteraciones metabólicas, son en pro de mantener e incluso incrementar la concentración de ATP.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdurrachim, D., Ciapaite, J., Wessels, B., Nabben, M., Luiken, J. J. F. P., Nicolay, K., & Prompers, J. J. (2014). Cardiac diastolic dysfunction in high-fat diet fed mice is associated with lipotoxicity without impairment of cardiac energetics in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1841*(10), 1525–1537. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.07.016>
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, *32*(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C. T., & Enríquez, J. A. (2004). Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. *Molecular Cell*, *13*(6), 805–815. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00124-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00124-8)
- American Heart Association. (2018). *Sugar 101*. <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/sugar/sugar-101>
- Amin, K. A., Kamel, H. H., & Abd Eltawab, M. A. (2011). The relation of high fat diet, metabolic disturbances and brain oxidative dysfunction: modulation by hydroxy citric acid. *Lipids in Health and Disease*, *10*(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-74>
- Aoyama, K., & Nakaki, T. (2013). Impaired Glutathione Synthesis in Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 21021–21044. <https://doi.org/10.3390/ijms141021021>
- Arboleda, G., Huang, T.-J., Waters, C., Verkhatsky, A., Fernyhough, P., & Gibson, R. M. (2007). Insulin-like growth factor-1-dependent maintenance of neuronal metabolism through the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway is inhibited by C2-ceramide in CAD cells. *European Journal of Neuroscience*, *25*(10), 3030–3038. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05557.x>
- Arboleda, G., Morales, L. C., Benítez, B., & Arboleda, H. (2009). Regulation of ceramide-induced neuronal death: Cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, *59*(2), 333–346. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.10.001>
- Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H.-Y., Ahima, R. S., Craft, S., Gandy, S., Buettner, C., Stoeckel, L. E., Holtzman, D. M., & Nathan, D. M. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews Neurology*, *14*(3), 168–181. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185>

- Arnold, S. E., Lucki, I., Brookshire, B. R., Carlson, G. C., Browne, C. A., Kazi, H., Bang, S., Choi, B.-R., Chen, Y., McMullen, M. F., & Kim, S. F. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of Disease*, *67*, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.011>
- Baek, S. H., Park, S. J., Jeong, J. I., Kim, S. H., Han, J., Kyung, J. W., Baik, S.-H., Choi, Y., Choi, B. Y., Park, J. S., Bahn, G., Shin, J. H., Jo, D. S., Lee, J.-Y., Jang, C.-G., Arumugam, T. V., Kim, J., Han, J.-W., Koh, J.-Y., ... Jo, D.-G. (2017). Inhibition of Drp1 Ameliorates Synaptic Depression, A β Deposition, and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *The Journal of Neuroscience*, *37*(20), 5099–5110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2385-16.2017>
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology & Therapeutics*, *136*(1), 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.006>
- Baquedano, E., Burgos-Ramos, E., Canelles, S., González-Rodríguez, A., Chowen, J. A., Argente, J., Barrios, V., Valverde, A. M., & Frago, L. M. (2016). Increased oxidative stress and apoptosis in the hypothalamus of diabetic male mice in the insulin receptor substrate-2 knockout model. *Disease Models & Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.023515>
- Baranowski, B. J., & MacPherson, R. E. K. (2018). Acute exercise induced BDNF-TrkB signalling is intact in the prefrontal cortex of obese, glucose-intolerant male mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *43*(10), 1083–1089. <https://doi.org/10.1139/apnm-2018-0108>
- Barraza-Lloréns, M., Guajardo-Barrón, V., Picó, J., García, R., Hernández, C., Mora, F., Athié, J., Crable, E., & Urtiz, A. (2015). *Carga económica de la diabetes mellitus en México*. <https://funsalud.org.mx/wp-content/uploads/2019/11/Carga-Economica-Diabetes-en-Mexico-2013.pdf>
- Basu Ball, W., Neff, J. K., & Gohil, V. M. (2018). The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS Letters*, *592*(8), 1273–1290. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12887>
- Benedict, C., & Grillo, C. A. (2018). Insulin Resistance as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease: A State-of-the-Art Review. *Frontiers in Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00215>
- Berndtsson, J., Aufschnaiter, A., Rathore, S., Marin-Buera, L., Dawitz, H., Diessl, J., Kohler, V., Barrientos, A., Büttner, S., Fontanesi, F., & Ott, M. (2020). Respiratory supercomplexes enhance electron transport by decreasing cytochrome *c* diffusion distance. *EMBO Reports*, *21*(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051015>
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress

- in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., & Ruiz-Albusac, J. M. (2014). Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Endocrinology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161>
- Bloom, D. ., Cafiero, E. ., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L. ., Fathima, S., Feigl, A. ., Gaziano, T., Mowafi, M., Pandya, A., Prettner, K., Rosenberg, L., Selingman, B., Stein, A. ., & Weinstein, C. (2011). *The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. Geneva: World Economic Forum.* https://www3.weforum.org/docs/WEF_Harvard_HE_GlobalEconomicBurdenNonCommunicableDiseases_2011.pdf
- Bocarsly, M. E., Fasolino, M., Kane, G. A., LaMarca, E. A., Kirschen, G. W., Karatsoreos, I. N., McEwen, B. S., & Gould, E. (2015). Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15731–15736. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511593112>
- Borys, J., Maciejczyk, M., Antonowicz, B., Krętowski, A., Sidun, J., Domel, E., Dąbrowski, J., Ładny, J., Morawska, K., & Zalewska, A. (2019). Glutathione Metabolism, Mitochondria Activity, and Nitrosative Stress in Patients Treated for Mandible Fractures. *Journal of Clinical Medicine*, 8(1), 127. <https://doi.org/10.3390/jcm8010127>
- Bovolini, A., Garcia, J., Andrade, M. A., & Duarte, J. A. (2021). Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *International Journal of Sports Medicine*, 42(03), 199–214. <https://doi.org/10.1055/a-1263-0898>
- Butterfield, D. A., Di Domenico, F., & Barone, E. (2014). Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(9), 1693–1706. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.010>
- Cacho, J., Sevillano, J., de Castro, J., Herrera, E., & Ramos, M. P. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(5), E1269–E1276. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90207.2008>
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2009). PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current Opinion in Lipidology*, 20(2), 98–105. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328328d0a4>

- Carmo, C., Naia, L., Lopes, C., & Rego, A. C. (2018). *Mitochondrial Dysfunction in Huntington's Disease* (pp. 59–83). https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_3
- Cavaliere, G., Viggiano, E., Trinchese, G., De Filippo, C., Messina, A., Monda, V., Valenzano, A., Cincione, R. I., Zammit, C., Cimmino, F., Catapano, A., Sessa, F., Messina, G., Monda, M., Crispino, M., & Mollica, M. P. (2018). Long Feeding High-Fat Diet Induces Hypothalamic Oxidative Stress and Inflammation, and Prolonged Hypothalamic AMPK Activation in Rat Animal Model. *Frontiers in Physiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00818>
- Champe, P. C. ., & Harvey, R. A. (1994). *Biochemistry* (Second Edi). https://books.google.com.pe/books?id=M_YOW50cg9oC&printsec=copyright#v=onepage&q&f=false
- Chavez, J. A., & Summers, S. A. (2012). A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, *15*(5), 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.002>
- Chen, C., Turnbull, D. M., & Reeve, A. K. (2019). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease—Cause or Consequence? *Biology*, *8*(2), 38. <https://doi.org/10.3390/biology8020038>
- Chen, D., Li, X., Zhang, L., Zhu, M., & Gao, L. (2018). A high-fat diet impairs mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and the respiratory chain complex in rat myocardial tissues. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(11), 9602–9602. <https://doi.org/10.1002/jcb.27068>
- Cheng, Z., Tseng, Y., & White, M. F. (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(10), 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.005>
- Choromańska, M., Klimiuk, A., Kostecka-Sochoń, P., Wilczyńska, K., Kwiatkowski, M., Okuniewska, N., Waszkiewicz, N., Zalewska, A., & Maciejczyk, M. (2017). Antioxidant Defence, Oxidative Stress and Oxidative Damage in Saliva, Plasma and Erythrocytes of Dementia Patients. Can Salivary AGE be a Marker of Dementia? *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), 2205. <https://doi.org/10.3390/ijms18102205>
- Chunchai, T., Samniang, B., Sripetchwandee, J., Pintana, H., Pongkan, W., Kumfu, S., Shinlapawittayatorn, K., KenKnight, B. H., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2016). Vagus Nerve Stimulation Exerts the Neuroprotective Effects in Obese-Insulin Resistant Rats, Leading to the Improvement of Cognitive Function. *Scientific Reports*, *6*(1), 26866. <https://doi.org/10.1038/srep26866>
- Cobb, C. A., & Cole, M. P. (2015). Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, *84*, 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.020>
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to

- oxidative stress. *Redox Biology*, *15*, 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Cogliati, S., Cabrera-Alarcón, J. L., & Enriquez, J. A. (2021). Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochemical Society Transactions*, *49*(6), 2655–2668. <https://doi.org/10.1042/BST20210460>
- Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C., & Mattson, M. P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(7), 2070–2075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305799101>
- Davey, G. P., Peuchen, S., & Clark, J. B. (1998). Energy Thresholds in Brain Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(21), 12753–12757. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12753>
- de la Monte, S., Derdak, Z., & Wands, J. R. (2012). Alcohol, insulin resistance and the liver-brain axis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *27*, 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07023.x>
- de la Monte, S. M., Lyn-Cook Jr, L. E., Lawton, M., Tong, M., Silbermann, E., Longato, L., Jiao, P., Mark, P., Xu, H., & Wands, J. R. (2011). Hepatic ceramide may mediate brain insulin resistance and neurodegeneration in type 2 diabetes and non-alcoholic steatohepatitis. In *Handbook of Animal Models in Alzheimer's Disease* (pp. 179–199). <https://doi.org/10.3233/978-1-60750-733-8-179>
- de la Monte, S. M., Re, E., Longato, L., & Tong, M. (2012). Dysfunctional Pro-Ceramide, ER Stress, and Insulin/IGF Signaling Networks with Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *30*(s2), S217–S229. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111728>
- de la Monte, S. M., & Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.012>
- de la Monte, S. M., Tong, M., Nguyen, V., Setshedi, M., Longato, L., & Wands, J. R. (2010). Ceramide-Mediated Insulin Resistance and Impairment of Cognitive-Motor Functions. *Journal of Alzheimer's Disease*, *21*(3), 967–984. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091726>
- de la Monte, S. M., Tong, M., & Wands, J. R. (2018). The 20-Year Voyage Aboard the Journal of Alzheimer's Disease: Docking at 'Type 3 Diabetes', Environmental/Exposure Factors, Pathogenic Mechanisms, and Potential Treatments. *Journal of Alzheimer's Disease*, *62*(3), 1381–1390. <https://doi.org/10.3233/JAD-170829>
- Diaz, F., Garcia, S., Padgett, K. R., & Moraes, C. T. (2012). A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions.

Human Molecular Genetics, 21(23), 5066–5077. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds350>

- Dionysopoulou, S., Charmandari, E., Bargiota, A., Vlahos, N. F., Mastorakos, G., & Valsamakis, G. (2021). The Role of Hypothalamic Inflammation in Diet-Induced Obesity and Its Association with Cognitive and Mood Disorders. *Nutrients*, 13(2), 498. <https://doi.org/10.3390/nu13020498>
- Dragicevic, N., Mamcarz, M., Zhu, Y., Buzzeo, R., Tan, J., Arendash, G. W., & Bradshaw, P. C. (2010). Mitochondrial Amyloid- β Levels are Associated with the Extent of Mitochondrial Dysfunction in Different Brain Regions and the Degree of Cognitive Impairment in Alzheimer's Transgenic Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s2), S535–S550. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100342>
- Dringen, R., & Hirrlinger, J. (2003). Glutathione Pathways in the Brain. *Biological Chemistry*, 384(4). <https://doi.org/10.1515/BC.2003.059>
- Fahed, G., Aoun, L., Bou Zerdan, M., Allam, S., Bou Zerdan, M., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 786. <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G. N., & Radi, E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 322(1–2), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.05.030>
- Feldman, D. E. (2009). Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 33–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135516>
- Feng, Y., & Wang, X. (2012). Antioxidant Therapies for Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2012/472932>
- Filippi, B. M., Abraham, M. A., Silva, P. N., Rasti, M., LaPierre, M. P., Bauer, P. V., Rocheleau, J. V., & Lam, T. K. T. (2017). Dynamin-Related Protein 1-Dependent Mitochondrial Fission Changes in the Dorsal Vagal Complex Regulate Insulin Action. *Cell Reports*, 18(10), 2301–2309. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.035>
- Folch, J., Olloquequi, J., Ettcheto, M., Busquets, O., Sánchez-López, E., Cano, A., Espinosa-Jiménez, T., García, M. L., Beas-Zarate, C., Casadesús, G., Bulló, M., Auladell, C., & Camins, A. (2019). The Involvement of Peripheral and Brain Insulin Resistance in Late Onset Alzheimer's Dementia. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00236>
- Frisardi, V., Solfrizzi, V., Seripa, D., Capurso, C., Santamato, A., Sancarlo, D., Vendemiale, G., Pilotto, A., & Panza, F. (2010). Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 9(4), 399–417.

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.04.007>

- Galizzi, G., & Di Carlo, M. (2022). Insulin and Its Key Role for Mitochondrial Function/Dysfunction and Quality Control: A Shared Link between Dysmetabolism and Neurodegeneration. *Biology*, *11*(6), 943. <https://doi.org/10.3390/biology11060943>
- Gancheva, S., Jelenik, T., Álvarez-Hernández, E., & Roden, M. (2018). Interorgan Metabolic Crosstalk in Human Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *98*(3), 1371–1415. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2017>
- Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
- Ganesan, V., Perera, M. N., Colombini, D., Datskovskiy, D., Chadha, K., & Colombini, M. (2010). Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis*, *15*(5), 553–562. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0449-0>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*, *107*(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Goldfein, K. R., & Slavin, J. L. (2015). Why Sugar Is Added to Food: Food Science 101. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(5), 644–656. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12151>
- Gómez Delgado, Y., & Velázquez Rodríguez, E. B. (2019). Health and food culture in Mexico. *Revista Digital Universitaria*, *20*(1). <https://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a6>
- Gray, S. M., Meijer, R. I., & Barrett, E. J. (2014). Insulin Regulates Brain Function, but How Does It Get There? *Diabetes*, *63*(12), 3992–3997. <https://doi.org/10.2337/db14-0340>
- Gutiérrez-Robledo, L. Arrieta-Cruz, I. (2015). *Demencias en México: la necesidad de un Plan de Acción*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2015/gm155p.pdf>
- Hall, K. D., Ayuketah, A., Brychta, R., Cai, H., Cassimatis, T., Chen, K. Y., Chung, S. T., Costa, E., Courville, A., Darcey, V., Fletcher, L. A., Forde, C. G., Gharib, A. M., Guo, J., Howard, R., Joseph, P. V., McGehee, S., Ouwwerkerk, R., Raisinger, K., ... Zhou, M. (2019). Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metabolism*, *30*(1), 67-77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.008>
- Haus, J. M., Kashyap, S. R., Kasumov, T., Zhang, R., Kelly, K. R., DeFronzo, R. A., & Kirwan, J. P. (2009). Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. *Diabetes*, *58*(2), 337–343.

<https://doi.org/10.2337/db08-1228>

- He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C.-X., & Schuchman, E. H. (2010). Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *31*(3), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.010>
- Henriksen, E. J., Diamond-Stanic, M. K., & Marchionne, E. M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(5), 993–999. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005>
- Holloway, G. P., Han, X. X., Jain, S. S., Bonen, A., & Chabowski, A. (2014). Chronic muscle stimulation improves insulin sensitivity while increasing subcellular lipid droplets and reducing selected diacylglycerol and ceramide species in obese Zucker rats. *Diabetologia*, *57*(4), 832–840. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3169-0>
- ISHIZUKA, B., QUIGLEY, M. E., & YEN, S. S. C. (1983). Pituitary Hormone Release in Response to Food Ingestion: Evidence for Neuroendocrine Signals from Gut to Brain*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *57*(6), 1111–1116. <https://doi.org/10.1210/jcem-57-6-1111>
- Jais, A., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(1), 24–32. <https://doi.org/10.1172/JCI88878>
- Jana, A., Hogan, E. L., & Pahan, K. (2009). Ceramide and neurodegeneration: Susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *Journal of the Neurological Sciences*, *278*(1–2), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.12.010>
- Javadov, S., Jang, S., Chapa-Dubocq, X. R., Khuchua, Z., & Camara, A. K. (2021). Mitochondrial respiratory supercomplexes in mammalian cells: structural versus functional role. *Journal of Molecular Medicine*, *99*(1), 57–73. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-02004-8>
- Jha, D., & Mitra Mazumder, P. (2019). High fat diet administration leads to the mitochondrial dysfunction and selectively alters the expression of class 1 GLUT protein in mice. *Molecular Biology Reports*, *46*(2), 1727–1736. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04623-y>
- Jha, S. K., Jha, N. K., Kumar, D., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2017). Linking mitochondrial dysfunction, metabolic syndrome and stress signaling in Neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1863*(5), 1132–1146. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.015>
- Johnson, W. M., Wilson-Delfosse, A. L., & Mיעyal, J. J. (2012). Dysregulation of Glutathione Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*, *4*(10), 1399–1440. <https://doi.org/10.3390/nu4101399>
- Juranek, J., Ray, R., Banach, M., & Rai, V. (2015). Receptor for advanced glycation end-products

- in neurodegenerative diseases. *Reviews in the Neurosciences*, 26(6), 691–698. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0003>
- Kang, K.-W., Kim, O.-S., Chin, J. Y., Kim, W. H., Park, S. H., Choi, Y. J., Shin, J. H., Jung, K. T., Lim, D.-S., & Lee, S.-K. (2015). Diastolic Dysfunction Induced by a High-Fat Diet Is Associated with Mitochondrial Abnormality and Adenosine Triphosphate Levels in Rats. *Endocrinology and Metabolism*, 30(4), 557. <https://doi.org/10.3803/EnM.2015.30.4.557>
- Kaur, P., Aschner, M., & Syversen, T. (2007). Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury-induced oxidative stress. *Toxicology*, 230(2–3), 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.058>
- Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V., & Ritov, V. B. (2002). Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 51(10), 2944–2950. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2944>
- Kim, J. M., Park, C. H., Park, S. K., Seung, T. W., Kang, J. Y., Ha, J. S., Lee, D. S., Lee, U., Kim, D.-O., & Heo, H. J. (2017). Ginsenoside Re Ameliorates Brain Insulin Resistance and Cognitive Dysfunction in High Fat Diet-Induced C57BL/6 Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2719–2729. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00297>
- Kim, J., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2008). Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance. *Circulation Research*, 102(4), 401–414. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165472>
- Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes*, 63(7), 2232–2243. <https://doi.org/10.2337/db14-0568>
- Koga, M., Serritella, A. V., Messmer, M. M., Hayashi-Takagi, A., Hester, L. D., Snyder, S. H., Sawa, A., & Sedlak, T. W. (2011). Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(4), 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.087>
- Koliaki, C., & Roden, M. (2016). Alterations of Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Human Obesity and Diabetes Mellitus. *Annual Review of Nutrition*, 36(1), 337–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050656>
- Kołodziej, U., Maciejczyk, M., Miąsko, A., Matczuk, J., Knaś, M., Żukowski, P., Żendzian-Piotrowska, M., Borys, J., & Zalewska, A. (2017). Oxidative Modification in the Salivary Glands of High Fat-Diet Induced Insulin Resistant Rats. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00020>
- Kothari, V., Luo, Y., Tornabene, T., O’Neill, A. M., Greene, M. W., Geetha, T., & Babu, J. R. (2017). High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 499–508.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.006>

- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P. M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., & Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, *340*(6140), 1567–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1230381>
- Letts, J. A., Fiedorczuk, K., Degliesposti, G., Skehel, M., & Sazanov, L. A. (2019). Structures of Respiratory Supercomplex I+III₂ Reveal Functional and Conformational Crosstalk. *Molecular Cell*, *75*(6), 1131–1146.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.022>
- Ling, C., Poulsen, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Almgren, P., Wojtaszewski, J., Beck-Nielsen, H., Groop, L., & Vaag, A. (2004). Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1 α and PGC-1 β gene expression in twins. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(10), 1518–1526. <https://doi.org/10.1172/JCI21889>
- Liu, Z., Patil, I. Y., Jiang, T., Sancheti, H., Walsh, J. P., Stiles, B. L., Yin, F., & Cadenas, E. (2015). High-Fat Diet Induces Hepatic Insulin Resistance and Impairment of Synaptic Plasticity. *PLOS ONE*, *10*(5), e0128274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128274>
- Lobo-Jarne, T., & Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *76*, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.021>
- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., Murphy, M. P., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2016). Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(46), 13063–13068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613701113>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, *224*, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Maciejczyk, M., Matczuk, J., Żendzian-Piotrowska, M., Niklińska, W., Fejfer, K., Szarmach, I., Ładny, J., Zieniewska, I., & Zalewska, A. (2018). Eight-Week Consumption of High-Sucrose Diet Has a Pro-Oxidant Effect and Alters the Function of the Salivary Glands of Rats. *Nutrients*, *10*(10), 1530. <https://doi.org/10.3390/nu10101530>
- Maciejczyk, M., Szulimowska, J., Skutnik, A., Taranta-Janusz, K., Wasilewska, A., Wiśniewska, N., & Zalewska, A. (2018). Salivary Biomarkers of Oxidative Stress in Children with Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical Medicine*, *7*(8), 209. <https://doi.org/10.3390/jcm7080209>
- Maciejczyk, M., Żebrowska, E., & Chabowski, A. (2019). Insulin Resistance and Oxidative Stress

- in the Brain: What's New? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 874. <https://doi.org/10.3390/ijms20040874>
- Maciejczyk, M., Żebrowska, E., Zalewska, A., & Chabowski, A. (2018). Redox Balance, Antioxidant Defense, and Oxidative Damage in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of Rats with High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/6940515>
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(13), 1469–1480. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4845>
- Martin, S. D., & McGee, S. L. (2014). The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4), 1303–1312. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.019>
- Matsuda, M., & DeFronzo, R. A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*, 22(9), 1462–1470. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.9.1462>
- Mecocci, P., & Polidori, M. C. (2012). Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.006>
- Mencarelli, C., & Martinez–Martinez, P. (2013). Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(2), 181–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1038-x>
- Montgomery, M. K., & Turner, N. (2015). Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine Connections*, 4(1), R1–R15. <https://doi.org/10.1530/EC-14-0092>
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., ... Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, 34(3), 267–273. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
- Morales, A., Lee, H., Goñi, F. M., Kolesnick, R., & Fernandez-Checa, J. C. (2007). Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 923–939. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0721-0>
- Morley, J. E., Farr, S. A., & Nguyen, A. D. (2018). Alzheimer Disease. *Clinics in Geriatric Medicine*, 34(4), 591–601. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2018.06.006>

- Münch, G., Schinzel, R., Loske, C., Wong, A., Durany, N., Li, J. J., Vlassara, H., Smith, M. A., Perry, G., & Riederer, P. (1998). Alzheimer's disease – synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Journal of Neural Transmission*, *105*(4), 439. <https://doi.org/10.1007/s007020050069>
- Nelson, T. J., Sun, M.-K., Hongpaisan, J., & Alkon, D. L. (2008). Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *European Journal of Pharmacology*, *585*(1), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.051>
- Nesci, S., Trombetti, F., Pagliarani, A., Ventrella, V., Algieri, C., Tioli, G., & Lenaz, G. (2021). Molecular and Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System: Implications for Pathology. *Life*, *11*(3), 242. <https://doi.org/10.3390/life11030242>
- Novack, G. V., Galeano, P., Castaño, E. M., & Morelli, L. (2020). Mitochondrial Supercomplexes: Physiological Organization and Dysregulation in Age-Related Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00600>
- OMS. (1990). *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas*. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38855/WHO_TRS_797_\(part1\)_spa.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38855/WHO_TRS_797_(part1)_spa.pdf?sequence=1)
- Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, *2*, 411–429. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016>
- Palleria, C., Leporini, C., Maida, F., Succurro, E., De Sarro, G., Arturi, F., & Russo, E. (2016). Potential effects of current drug therapies on cognitive impairment in patients with type 2 diabetes. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *42*, 76–92. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.07.002>
- Panes, J., Wendt, A., Ramirez-Molina, O., Castro, P., & Fuentealba, J. (2022). Deciphering the role of PGC-1 α in neurological disorders: from mitochondrial dysfunction to synaptic failure. *Neural Regeneration Research*, *17*(2), 237. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.317957>
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. M. (2001). Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion*, *1*(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(01\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(01)00011-3)
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. M. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*, *286*(1), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00814-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00814-9)
- Patti, M. E., Butte, A. J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E. J., Goldfine, A. B., Mun, E., DeFronzo, R.,

- Finlayson, J., Kahn, C. R., & Mandarino, L. J. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(14), 8466–8471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1032913100>
- Peinado, J. R., Diaz-Ruiz, A., Frühbeck, G., & Malagon, M. M. (2014). Mitochondria in metabolic disease: Getting clues from proteomic studies. *PROTEOMICS*, *14*(4–5), 452–466. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300376>
- Peng, Y., Liu, J., Shi, L., Tang, Y., Gao, D., Long, J., & Liu, J. (2016). Mitochondrial dysfunction precedes depression of AMPK/AKT signaling in insulin resistance induced by high glucose in primary cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, *137*(5), 701–713. <https://doi.org/10.1111/jnc.13563>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *98*(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- PETROSILLO, G., MATERA, M., CASANOVA, G., RUGGIERO, F., & PARADIES, G. (2008). Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochemistry International*, *53*(5), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.07.001>
- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F. X., Barroso, E., Pallàs, M., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., Vazquez-Carrera, M., Folch, J., & Camins, A. (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1852*(9), 1687–1699. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.004>
- Pi-Sunyer, F. X. (2000). Overnutrition and undernutrition as modifiers of metabolic processes in disease states. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(2), 533S–537S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.533S>
- Pini, M., Czibik, G., Sawaki, D., Mezdari, Z., Braud, L., Delmont, T., Mercedes, R., Martel, C., Buron, N., Marcelin, G., Borgne-Sanchez, A., Foresti, R., Motterlini, R., Henegar, C., & Derumeaux, G. (2021). Adipose tissue senescence is mediated by increased ATP content after a short-term high-fat diet exposure. *Aging Cell*, *20*(8). <https://doi.org/10.1111/accel.13421>
- Pintana, H., Tanajak, P., Pratchayasakul, W., Sa-nguanmoo, P., Chunchai, T., Satjaritanun, P., Leelarphat, L., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2016). Energy restriction combined with dipeptidyl peptidase-4 inhibitor exerts neuroprotection in obese male rats. *British Journal of Nutrition*, *116*(10), 1700–1708. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003871>
- Pipatpiboon, N., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2012). PPAR γ

- Agonist Improves Neuronal Insulin Receptor Function in Hippocampus and Brain Mitochondria Function in Rats with Insulin Resistance Induced by Long Term High-Fat Diets. *Endocrinology*, 153(1), 329–338. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1502>
- Porter, D., Faivre, E., Flatt, P. R., Hölscher, C., & Gault, V. A. (2012). Actions of incretin metabolites on locomotor activity, cognitive function and in vivo hippocampal synaptic plasticity in high fat fed mice. *Peptides*, 35(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.014>
- Potukuchi, A., Addepally, U., Sindhu, K., & Manchala, R. (2018). Increased total DNA damage and oxidative stress in brain are associated with decreased longevity in high sucrose diet fed WNIN/Gr-Ob obese rats. *Nutritional Neuroscience*, 21(9), 648–656. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1332509>
- Pugazhenthii, S., Qin, L., & Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1037–1045. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017>
- Qin, L., Liu, Y., Hong, J.-S., & Crews, F. T. (2013). NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia*, 61(6), 855–868. <https://doi.org/10.1002/glia.22479>
- Raider, K., Ma, D., Harris, J. L., Fuentes, I., Rogers, R. S., Wheatley, J. L., Geiger, P. C., Yeh, H.-W., Choi, I.-Y., Brooks, W. M., & Stanford, J. A. (2016). A high fat diet alters metabolic and bioenergetic function in the brain: A magnetic resonance spectroscopy study. *Neurochemistry International*, 97, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.04.008>
- Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006>
- Raza, H., John, A., & Howarth, F. C. (2015). Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Zucker Diabetic Rat Liver and Brain. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(3), 1241–1251. <https://doi.org/10.1159/000373947>
- Reaven, G. M. (2005). THE INSULIN RESISTANCE SYNDROME: Definition and Dietary Approaches to Treatment. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 391–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155>
- Richardson, D. K., Kashyap, S., Bajaj, M., Cusi, K., Mandarino, S. J., Finlayson, J., DeFronzo, R. A., Jenkinson, C. P., & Mandarino, L. J. (2005). Lipid Infusion Decreases the Expression of Nuclear Encoded Mitochondrial Genes and Increases the Expression of Extracellular Matrix Genes in Human Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10290–10297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408985200>
- Roberts, C. K., Hevener, A. L., & Barnard, R. J. (2013). Metabolic Syndrome and Insulin

- Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1–58). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110062>
- Rodríguez Vázquez, L. (2012). Prácticas, hábitos y conductas vs educación y cultura alimentarias. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 18(1), 39–52.
- Ruegsegger, G. N., Vanderboom, P. M., Dasari, S., Klaus, K. A., Kabiraj, P., McCarthy, C. B., Lucchinetti, C. F., & Nair, K. S. (2019). Exercise and metformin counteract altered mitochondrial function in the insulin-resistant brain. *JCI Insight*, 4(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130681>
- Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2007). Mitochondrial-Nuclear Communications. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 701–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720>
- Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Kerdphoo, S., Satjaritanun, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Prachayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2016). FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Hormones and Behavior*, 85, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.08.006>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Soininen, H., & Hiltunen, M. (2011). AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 118(4), 460–474. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07331.x>
- Samuel, V. T. (2011). Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(2), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.003>
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, 148(5), 852–871. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
- SchÄgger, H. (2001). Respiratory Chain Supercomplexes. *IUBMB Life*, 52, 119–128. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/15216540152845911>
- Schechter, R., Whitmire, J., Holtzclaw, L., George, M., Harlow, R., & Devaskar, S. U. (1992). Developmental regulation of insulin in the mammalian central nervous system. *Brain Research*, 582(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90313-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90313-X)
- Schell, M., Wardelmann, K., & Kleinridders, A. (2021). Untangling the effect of insulin action on brain mitochondria and metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(4). <https://doi.org/10.1111/jne.12932>
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., & Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 4904–4911. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01595.x>

- Secretaria de Salud. (2018). *Enfermedades No Transmisibles Situación y Propuestas de Acción: Una Perspectiva desde la Experiencia de México*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/416454/Enfermedades_No_Transmisibles_ebook.pdf
- Secretaría de Salud. (2019). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*.
- Shukla, V., Mishra, S. K., & Pant, H. C. (2011). Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Advances in Pharmacological Sciences, 2011*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/572634>
- Small, D. M., & DiFeliceantonio, A. G. (2019). Processed foods and food reward. *Science, 363*(6425), 346–347. <https://doi.org/10.1126/science.aav0556>
- Song, F., Hurtado del Pozo, C., Rosario, R., Zou, Y. S., Ananthakrishnan, R., Xu, X., Patel, P. R., Benoit, V. M., Yan, S. F., Li, H., Friedman, R. A., Kim, J. K., Ramasamy, R., Ferrante, A. W., & Schmidt, A. M. (2014). RAGE Regulates the Metabolic and Inflammatory Response to High-Fat Feeding in Mice. *Diabetes, 63*(6), 1948–1965. <https://doi.org/10.2337/db13-1636>
- Song, I., & Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences, 25*(11), 578–588. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02270-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02270-1)
- Srikanth, V., Maczurek, A., Phan, T., Steele, M., Westcott, B., Juskiw, D., & Münch, G. (2011). Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging, 32*(5), 763–777. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.016>
- Sripetchwandee, J., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2018). Links Between Obesity-Induced Brain Insulin Resistance, Brain Mitochondrial Dysfunction, and Dementia. *Frontiers in Endocrinology, 9*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00496>
- Starr, J. M. (2003). Increased blood-brain barrier permeability in type II diabetes demonstrated by gadolinium magnetic resonance imaging. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 74*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1136/jnmp.74.1.70>
- Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H.-J., & Scherbaum, W. A. (2004). Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiology & Behavior, 83*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.07.022>
- SUMMERS, S. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in Lipid Research, 45*(1), 42–72. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.11.002>
- Sun, Z., Zhan, L., Liang, L., Sui, H., Zheng, L., Sun, X., & Xie, W. (2016). ZiBu PiYin recipe prevents diabetes-associated cognitive decline in rats: possible involvement of ameliorating mitochondrial dysfunction, insulin resistance pathway and histopathological changes. *BMC*

- Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1177-y>
- Sverdlov, A. L., Elezaby, A., Behring, J. B., Bachschmid, M. M., Luptak, I., Tu, V. H., Siwik, D. A., Miller, E. J., Liesa, M., Shirihai, O. S., Pimentel, D. R., Cohen, R. A., & Colucci, W. S. (2015). High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.07.018>
- Szendroedi, J., Phielix, E., & Roden, M. (2012). The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(2), 92–103. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.138>
- Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wolf, B. A., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., & Arnold, S. E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1316–1338. <https://doi.org/10.1172/JCI59903>
- Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 456. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>
- Taylor, R. (2012). Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 61(4), 778–779. <https://doi.org/10.2337/db12-0073>
- Telford, J. E., Kilbride, S. M., & Davey, G. P. (2009). Complex I Is Rate-limiting for Oxygen Consumption in the Nerve Terminal. *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9109–9114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809101200>
- Tong, M., & de la Monte, S. M. (2009). Mechanisms of Ceramide-Mediated Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16(4), 705–714. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0983>
- Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., Lopez-Lopez, G., Muñoz-Arenas, G., Morales-Medina, J. C., Toxqui, V., Venegas, B., & Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, 69(9), 421–433. <https://doi.org/10.1002/syn.21832>
- Treviño, S., Waalkes, M. P., Flores Hernández, J. A., León-Chavez, B. A., Aguilar-Alonso, P., & Brambila, E. (2015). Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 583, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.010>
- Tschritter, O., Fritsche, A., Shirkavand, F., Machicao, F., Häring, H., & Stumvoll, M. (2003).

- Assessing the Shape of the Glucose Curve During an Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes Care*, 26(4), 1026–1033. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.4.1026>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vercellino, I., & Sazanov, L. A. (2021). Structure and assembly of the mammalian mitochondrial supercomplex CIII2CIV. *Nature*, 598(7880), 364–367. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03927-z>
- Verdile, G., Keane, K. N., Cruzat, V. F., Medic, S., Sabale, M., Rowles, J., Wijesekara, N., Martins, R. N., Fraser, P. E., & Newsholme, P. (2015). Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/105828>
- Villa, R. F., Ferrari, F., & Gorini, A. (2012). Energy metabolism of rat cerebral cortex, hypothalamus and hypophysis during ageing. *Neuroscience*, 227, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.041>
- Wang. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 30. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
- Wang, D., Yan, J., Chen, J., Wu, W., Zhu, X., & Wang, Y. (2015). Naringin Improves Neuronal Insulin Signaling, Brain Mitochondrial Function, and Cognitive Function in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(7), 1061–1071. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0201-y>
- Wautier, M.-P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., & Wautier, J.-L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 280(5), E685–E694. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E685>
- Whitmer, R. A. (2007). Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 7(5), 373–380. <https://doi.org/10.1007/s11910-007-0058-7>
- Wu, K. L., Hung, C.-Y., Chan, J. Y., & Wu, C.-W. (2014). An increase in adenosine-5'-triphosphate (ATP) content in rostral ventrolateral medulla is engaged in the high fructose diet-induced hypertension. *Journal of Biomedical Science*, 21(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-8>
- Yamagishi, S. (2018). *Diabetes and Aging-related Complications*. Humana Press. Sho-ichi Yamagishi

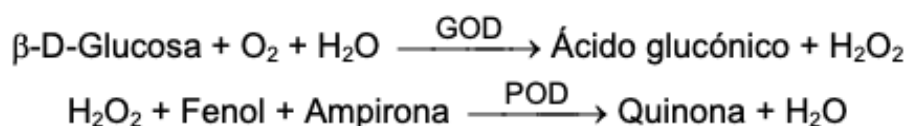
- Yki-Järvinen, H. (2010). Liver Fat in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Digestive Diseases*, 28(1), 203–209. <https://doi.org/10.1159/000282087>
- Żebrowska-Gamdzyk, M., Maciejczyk, M., Zalewska, A., Guzińska-Ustymowicz, K., Tokajuk, A., & Car, H. (2018). Whey Protein Concentrate WPC-80 Intensifies Glycoconjugate Catabolism and Induces Oxidative Stress in the Liver of Rats. *Nutrients*, 10(9), 1178. <https://doi.org/10.3390/nu10091178>
- Żendzian-Piotrowska, M., Łukaszuk, B., Maciejczyk, M., Ostrowska, L., Zalewska, A., Chabowski, A., & Kurek, K. (2019). High-fat, high-protein, and high-carbohydrate diets affect sphingolipid profile in pancreatic steatosis in Wistar rats. *Nutrition*, 60, 197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07023.x>
- ZHANG, X., DONG, F., REN, J., DRISCOLL, M., & CULVER, B. (2005). High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology*, 191(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.011>
- Zhao, W.-Q., & Alkon, D. L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177(1–2), 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00455-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00455-5)
- Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M. J., & Alkon, D. L. (1999). Brain Insulin Receptors and Spatial Memory. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34893–34902. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34893>
- Żukowski, P., Maciejczyk, M., Matczuk, J., Kurek, K., Waszkiel, D., Żendzian-Piotrowska, M., & Zalewska, A. (2018). Effect of N-Acetylcysteine on Antioxidant Defense, Oxidative Modification, and Salivary Gland Function in a Rat Model of Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/6581970>

ANEXO 1

a. Determinación de la concentración de glucosa

Método: Glucosa Oxidasa/Peroxidasa

Fundamento: La glucosa presente en la muestra se oxida a ácido glucónico por medio de la glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido en la reacción origina un complejo coloreado en presencia de peroxidasa (POD) que se cuantifica por espectrofotometría.



Procedimiento:

1. Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en un tubo de ensayo lo siguiente:

	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

4. Mezclar bien e incubar los tubos durante 10 min. a 37°C ó durante 30 min. a temperatura ambiente (15-25°C)
5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

Cálculos:

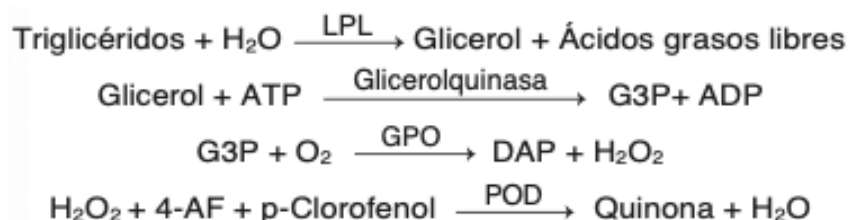
La concentración de glucosa en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula.

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times 100 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de glucosa en la muestra}$$

b. Determinación de la concentración de triglicéridos

Método: Glicerolfosfato deshidrogenasa- Peroxidasa

Fundamento: La lipoproteinlipasa (LPL) hidroliza los triglicéridos liberando glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol formado es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y H_2O_2 por GPO. Finalmente, el H_2O_2 reacciona con 4- aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja, con una intensidad proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra.



Procedimiento:

1. Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en un tubo de ensayo lo siguiente:

	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

4. Mezclar e incubar 5 minutos a 37oC o 10 min. a 15-25oC.
5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

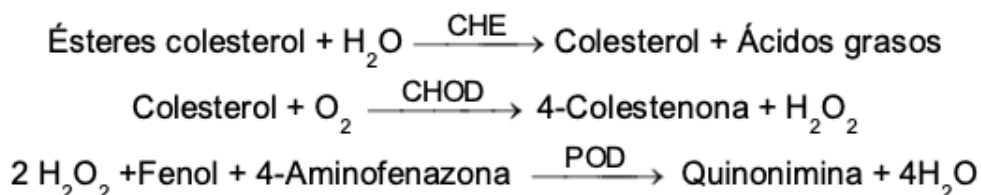
Cálculos:

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times \text{Conc. Patrón} = \text{mg/dl de triglicéridos}$$

c. Determinación de la concentración de colesterol total

Método: Colesterol oxidasa-Peroxidasa

Fundamento: La colesterol esterasa (CHE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol más ácidos grasos libres. En la siguiente reacción la colesterol oxidasa (CHOD) oxida el colesterol a colesteno y el H₂O₂ formado es sustrato de la peroxidasa que junto con 4-AF da lugar a la formación de una quinona roja que es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.



Procedimiento:

1. Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en un tubo de ensayo lo siguiente:

	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

4. Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C.
5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos

Cálculos:

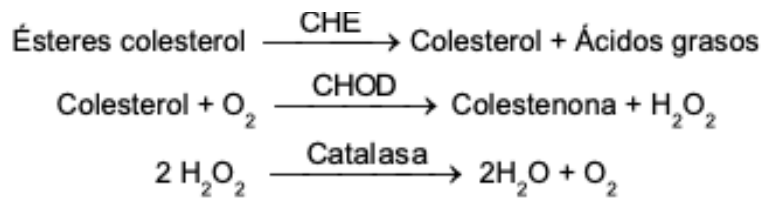
$$\frac{(A) \text{ Muestra}}{(A) \text{ Patrón}} \times \text{Conc. Patrón} = \text{mg/dl de colesterol en la muestra}$$

d. Determinación de la concentración de HDL-c

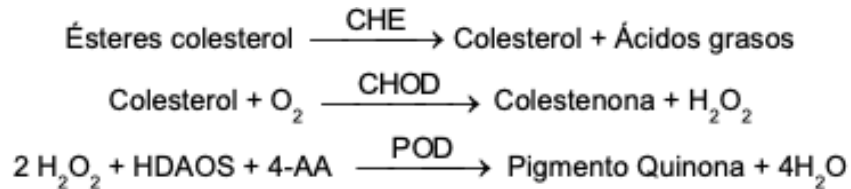
Método: Directo. Enzimático colorimétrico

Fundamento: Determinación directa del HDLc (colesterol de lipoproteínas de alta densidad) sin necesidad de pre-tratamiento o centrifugado de la muestra. La determinación se realiza en dos pasos: En la primera etapa se obtiene un producto no coloreado mientras que en la segunda etapa el N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (HDAOS) y 4-Aminoantipirina en presencia de la peroxidasa reaccionan por acción del H₂O₂ y generan un producto coloreado.

1. Eliminación de lipoproteínas no-HDL



2. Medición de HDLc



Procedimiento:

1. Condiciones del ensayo:
 Longitud de onda: 550-650 nm
 Cubeta: 1 cm paso de luz
 Temperatura: 37°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en un tubo de ensayo lo siguiente:

	Blanco	Calibrador	Muestra
Reactivo 1 (μL)	300	300	300
Calibrador (μL)	--	3	--
Muestra (μL)	--	--	3

4. Mezclar e incubar 5 min a 37°C y leer absorbancia (A1) del calibrador y la muestra
5. Añadir:

	Blanco	Calibrador	Muestra
Reactivo 2 (µL)	100	100	100

6. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C y leer la absorbancia (A2) frente al Blanco de reactivo.

Cálculos:

$$\frac{(A2 - A1) Muestra - (A2 - A1) Blanco}{(A2 - A1) Calibrador - (A2 - A1) Blanco} \times Conc. Calibrador = mg/dl de HDL - col$$

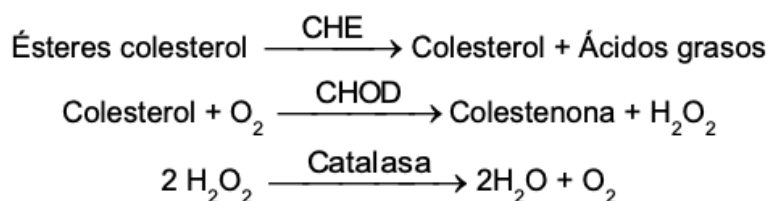
e. Determinación de la concentración de LDL-c

Método: Enzimático colorimétrico

Fundamento: Determinación directa del LDLc (colesterol de lipoproteínas de baja densidad) sin necesidad de pre-tratamiento o centrifugado de la muestra. La determinación se realiza en dos pasos:

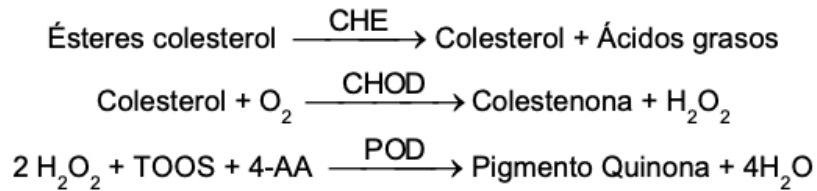
1. Eliminación de lipoproteínas no-LDL

La CHE hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres, a continuación, la CHOD oxida el colesterol a colesteno y peróxido de hidrógeno, la catalasa descompone el H₂O₂ a oxígeno y agua.



2. Medición de LDLc

En la segunda etapa se permite la reacción completa de CHE, CHOD y peroxidasa, el H₂O₂ reacciona con la 4-Aminoantipirina y el N-etil-N-(2-hidroxi-3-sul-fopropil)- 3-toluidina disódica (TOOS) generando un producto con color que se cuantifica espectrofotométricamente.



Procedimiento:

- Condiciones del ensayo:
 Longitud de onda: 600 (590-700) nm
 Cubeta: 1 cm paso de luz
 Temperatura: 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en un tubo de ensayo lo siguiente:

	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo 1 (µL)	300	300	300
Patrón (µL)	--	4	--
Muestra (µL)	--	--	4

- Mezclar e incubar 5 min a 37°C
- Añadir

	Blanco	Calibrador	Muestra
Reactivo 2 (µL)	100	100	100

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C y leer la absorbancia, frente al Blanco de reactivo

Cálculos:

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dl de LDL colesterol}$$

f. Determinación de la concentración de VLDL-col

Los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se obtendrán utilizando la estimación de Martin-Hopkins.

g. Determinación de la concentración de insulina

Fundamento: Se realizará por el método de inmunoensayo enzimático (ELISA) tipo sándwich. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en la microplaca a través de la interacción de estreptavidina revestida en los pozos y con el anticuerpo de insulina monoclonal marcado con biotina. Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo de sándwich soluble. Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno libre por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando diversas referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

Procedimiento

1. Sacar los micropozos necesarios para cada suero de referencia, controles y muestras. Colocar 50 μL de los sueros de referencia, controles y muestras en los pozos correspondientes.
2. Agregar 100 μL de la solución del Reactivo de la Enzima de Insulina a todos los pozos y golpear suavemente uno de los extremos de la microplaca por 20- 30 segundos para mezclar. Sellar la microplaca con una cubierta de plástico.
3. Incubar por 120 minutos a temperatura ambiente (20-27°C)
4. Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración.
5. Agregar 300 μL de la solución de lavado. Repetir dos veces adicionales.
6. Agregar 100 μL de la solución de sustrato a todos los pozos
7. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Agregar 50 μL de la solución de paro a cada pozo y mezclar suavemente de 15 a 20 segundos. Agregar siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
9. Leer la absorbancia en cada pozo a 450 nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector de microplacas. Los resultados se deben leer en el plazo de 30 minutos de haber agregado la solución de paro.

Cálculos

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de Insulina en especímenes desconocidos.

1. Registrar la absorbancia obtenida del listado del lector de microplacas.
2. Trazar la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Insulina en $\mu\text{U/mL}$.
3. Calcular la ecuación de la línea recta para la curva de calibración.
4. Para determinar la concentración de Insulina para un desconocido, despejar x de la ecuación de la línea recta.

h. Índices de resistencia a insulina

Matsuda-DeFronzo: Evalúa la resistencia a insulina a nivel sistémico, se cuantifica empleando la fórmula.

$$IR = \frac{10,000}{\sqrt{\left(Glucosa\ basal \left(\frac{mg}{dL} \right) * Insulina\ basal \left(\frac{\mu U}{mL} \right) \right) * \left(\bar{X}\ Glucosa\ TOG \left(\frac{mg}{dL} \right) * \bar{X}\ Insulina\ TOG \left(\frac{\mu U}{mL} \right) \right)}} \quad (\text{Matsuda \& DeFronzo, 1999})$$

HOMA-IR: Proporciona información sobre la resistencia a la insulina a nivel de tejido periférico.

$$HOMA - IR = \frac{Glucosa\ basal \left(\frac{mg}{dL} \right) * Insulina\ basal \left(\frac{\mu U}{mL} \right)}{2430} \quad (\text{Cacho et al., 2008})$$

ANEXO 2

Cuantificación de proteínas

Procedimiento:

1. Preparar diluciones del estándar de proteína de 0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/ml, usando la solución de dilución.
2. En cada tubo añadir 5 μ L de las muestras o el estándar correspondiente.
3. Añadir a cada tubo 1 mL del reactivo de Bradford, mezclar con un agitador vórtex, e incubar la reacción a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.
5. Hacer una curva de calibración estándar graficando la absorbancia a 595 nm contra la concentración de la proteína estándar.

ANEXO 3

Formación de complejos mitocondriales

a. Solubilizado con digitonina y corrimiento electroforético

1. Preparar un gel de acrilamida de gradiente de 3-13% para condiciones nativas.
2. Tomar 50 μg de corteza e hipocampo de cada grupo y colocar 1.5 mL de medio A, homogeneizar y poner en hielo.
3. Centrifugar 10 min a 1 800 rpm a 4°C. y tomar el sobrenadante.
4. Centrifugar 10 min a 10 000 rpm a 4°C y conservar el pellet.
5. Homogeneizar con 500 μL de medio A, centrifugar 10 min a 10 000 rpm a 4°C y conservar el pellet.
6. Repetir el paso anterior.
7. Homogeneizar con 200 μL de medio A y cuantificar proteínas.
8. A 100 μg de mitocondrias adicionar 10 μL de buffer aminocaproico y 8 μL de digitonina (10%), incubar 10 minutos en hielo y centrifugar 30 minutos a la máxima velocidad (18 000 rpm) a 4°C.
9. Tomar el sobrenadante y añadir 4 μL de buffer de BNGE
10. Tomar ≈ 22 μL del sobrenadante total y cargar en cada pocillo correspondiente del gel.
11. Verificar que no existan fugas entre el buffer del cátodo y el ánodo
12. Correr el gel 30 min 90 V y 60 min 300 V, dejar que salga todo el colorante.
13. Transferir o realizar actividad en gel

b. Transferencia de gel

1. Sacar el gel con cuidado y prepararlo para transferencia húmeda en membrana de PVDF (no olvidar activar la membrana con metanol).
2. Transferir durante 60 min a 90V.
3. Una vez concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x.
4. Bloquear la membrana con Alb 5%, 2h.
5. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.

c. Evaluación de la formación de supercomplejos

En la membrana transferida y bloqueada:

1. Incubar el anticuerpo primario para el CIV (ab14705) (1:5000) O/N a 4°C.
2. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
3. Incubar el anticuerpo secundario (1:10000) por 1 horas a temperatura ambiente.
4. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
5. Retirar la membrana del PBS, quitar el exceso y colocar en el fotodocumentador UVITEC Cambridge.
6. Colocar 250 μ L de Luminol reconstituido y cerrar la cámara.
7. Obtener la imagen correspondiente empleando el software Nine Alliance de UVITEC.
8. Lavar la membrana 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
9. Incubar el anticuerpo primario para el CI (ab14713) (1:5000) O/N a 4°C.
10. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
11. Incubar el anticuerpo secundario (1:10000) por 1 horas a temperatura ambiente.
12. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
13. En oscuridad, colocar 0.5 mL de Luminol e incubar durante 5 minutos.
14. Exponer al film durante 90 segundos y revelar.
15. Dejar secar el film y escanear para su análisis.
16. Lavar la membrana 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
17. Desnudar la membrana durante 15 minutos a temperatura ambiente para su posterior incubación.
18. Lavar la membrana 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
19. Incubar el anticuerpo primario para el CIII (ab14745) (1:5000) O/N 4°C.
20. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
21. Incubar el anticuerpo secundario (1:10000) por 1.5 horas a temperatura ambiente.
22. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
23. En oscuridad, colocar 0.5 mL de Luminol e incubar durante 5 minutos.
24. Exponer al film durante 90 segundos y revelar.
25. Dejar secar el film y escanear para su análisis.

26. Lavar la membrana 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
27. Incubar el anticuerpo primario para el CII (ab14715) (1:5000) O/N a 4°C.
28. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
29. Incubar el anticuerpo secundario (1:10000) por 1.5 horas a temperatura ambiente.
30. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
31. En oscuridad, colocar 0.5 mL de Luminol e incubar durante 5 minutos.
32. Exponer al film durante 90 segundos y revelar.
33. Dejar secar el film y escanear para su análisis.

d. Para la actividad en gel:

Los geles se corren por duplicado, en un gel se evalúan juntos el CI y CIII y en el otro el CIV

Soluciones:

- CI: 20 mL agua+ 2mM Tris-HCl, 0.1 mg/mL NADH, 2.5 mg/ml Cloruro de azul de nitrotetrazolio (NTB), preparar fresca cada vez, incubar alrededor de 1.5 h cuidando que no se sature el fondo.
- CIII: Colocar 20 mL de 1-step TMB blotting solution de Thermo Fisher durante alrededor de 3 h.
- CIV: Para 100 mL de sustrato añadir: 50 mg diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB), 100 mg cyt c, 90 ml de buffer de fosfato 50 mM pH 7.4, hacer 10 a 15 alícuotas y almacenar por varios meses a -20°C. Incubar 15 mL alrededor de 2 h.
- El orden de incubación es primero el CIV, y en el otro gel primero el CIII y luego el CI.

Al finalizar, colocar los geles en un acetato y escanear para su posterior análisis.

ANEXO 4

Western Blot: PGC-1 α

1. Preparar un gel de acrilamida para electroforesis-SDS al 7.5% en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos.
2. Colocar en un eppendorf 20 μ g de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI).
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes.
4. Correr el gel hasta la banda del marcador de peso molecular correspondiente, aproximadamente 10 min a 100 V y 1 h a 120 V
5. Sacar el gel con cuidado y prepararlo para transferencia húmeda en membrana de PVDF (no olvidar activar la membrana con metanol).
6. Transferir durante 60 min a 90V.
7. Una vez concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x.
8. Bloquear la membrana con Albúmina 5%, durante toda la noche.
9. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
10. Incubar el anticuerpo primario (ST1202) (1:1000) toda la noche a 4°C.
11. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario (1:2000) por 1.5 horas a temperatura ambiente.
13. Lavar 3 veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
14. Retirar la membrana del PBS, quitar el exceso y colocar en el fotodocumentador UVITEC Cambridge.
15. Colocar 250 μ L de Luminol reconstituido y cerrar la cámara.
16. Obtener la imagen correspondiente empleando el software Nine Alliance de UVITEC.

